



Université de Montréal

**Relation fonctionnelle entre CXCR4 et CXCR7  
dans le contrôle de la migration chimiotactique  
vers CXCL12**

**Rédigé par : Simon Lamothe**

Département de biochimie  
Faculté de médecine

Mémoire présenté à la faculté des études supérieures en  
vue de l'obtention du grade de maître en biochimie

Décembre 2012

© Lamothe, 2012

## RÉSUMÉ

Les chimiokines et leurs récepteurs sont responsables de la chimiotaxie des cellules dans l'organisme. Cette mobilité est nécessaire au bon fonctionnement du système immunitaire. Elle est aussi impliquée dans la dissémination métastatique de cancers. Le récepteur de chimiokines CXCR4 et son ligand SDF-1 sont tenus responsables de la chimiotaxie des cellules hématopoïétiques. Toutefois, l'étude de l'axe CXCR4-SDF-1 a récemment été complexifiée par la découverte d'un second récepteur de SDF-1, le récepteur CXCR7. Ces deux récepteurs sont exprimés majoritairement dans les mêmes types cellulaires et, ainsi, la découverte de CXCR7 incite à réévaluer les observations faites sur le couple SDF1-CXCR4. Le rôle de CXCR7 dans la chimiotaxie demeure incompris, mais il est possible que CXCR7 agisse en tant que régulateur sur l'axe CXCR4/SDF1.

Nous avons alors étudié les effets du niveau d'expression de CXCR7 sur les fonctions de CXCR4 lors de la chimiotaxie. Grâce à des techniques de migration *in vitro* et à la mesure des niveaux d'expression de CXCR4 et CXCR7, nos résultats suggèrent que CXCR7 serait un régulateur de l'axe CXCR4/SDF-1.

**Mots-Clefs :** CXCR7, CXCR4, SDF-1, chimiotaxie, moelle osseuse, migration cellulaire

## ABSTRACT

Chemokines and their receptors are responsible for the chemotaxis of cells in humans. This directed cellular mobility is a key part of the immune system, but is also involved in the metastatic dissemination of cancerous cells. The chemokine receptor CXCR4 and its ligand SDF-1 are responsible for the chemotaxis of hematopoietic stem cells. However, the study of the CXCR4/SDF-1 axis was complicated by the identification of CXCR7, a second receptor for SDF-1. The two receptors are generally expressed on the same cell types, and as a consequence, the regulation mechanism of the chemotaxis toward SDF-1 must be re-evaluated with this new information.

We have studied the consequence of CXCR7 expression on chemotaxis. Using *in-vitro* migration techniques and measuring expression levels of CXCR4 and CXCR7 our results support the hypothesis that CXCR7 acts as a regulator of the CXCR4/SDF-1 axis, contributing to the better understanding of the role of CXCR7 in chemotaxis.

**Key-words:** CXCR7, CXCR4, SDF-1, Chemokine receptor, chemotaxis, bone marrow, chemotaxis

# TABLE DES MATIÈRES

RÉSUMÉ	i
ASBTRACT	ii
TABLE DES MATIÈRES	iii
LISTE DES FIGURES	v
LISTE DES ABRÉVIATIONS	vii
REMERCIEMENTS	ix
<b>1. INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>1.1.0 Les cellules souches hématopoïétiques</b>	<b>2</b>
1.1.1 Les CSH dans la niche osseuse	3
1.1.2 La leucémie et les CSH	4
<b>1.2.0 La migration cellulaire dirigée</b>	<b>5</b>
1.2.1 Le gradient de migration	7
1.2.2 Les mécanismes moléculaires de la migration cellulaire	8
1.2.3 La migration des CSH vers la moelle	9
1.2.4 La mobilisation des CSH de la moelle	9
1.2.5 La dissémination des cellules leucémiques dans l'organisme	10
1.2.6 Le homing et les greffes de moelle osseuse dans la leucémie	11
1.2.7 Le rôle de la chimiotaxie dans les métastases cancéreuses	11
<b>1.3.0 Les cytokines</b>	<b>11</b>
1.3.1 Les chimiokines	13
1.3.2 La structure des chimiokines	15
<b>1.4.0 Les récepteurs couplés aux protéines G</b>	<b>17</b>
1.4.1 Les récepteurs de chimiokines	19
1.4.2 La signalisation générale empruntée par les chimiokines	20
<b>1.5.0 La chimiokine SDF-1 (CXCL12)</b>	<b>21</b>
1.5.1 L'implication de la chimiokine SDF-1 dans le cancer	22
1.5.2 La structure et la liaison de la chimiokine SDF-1	22
1.5.3 La relation ligand/récepteur inhabituelle de SDF-1	23
<b>1.6.0 Le récepteur CXCR4</b>	<b>25</b>
1.6.1 Expression et rôle de CXCR4	25
1.6.2 Les pathologies impliquant CXCR4	26
1.6.3 La structure du récepteur CXCR4	28
1.6.4 L'activation du récepteur CXCR4	28
1.6.5 La cascade de signalisation du récepteur CXCR4	29
1.6.6 L'homodimérisation des récepteurs CXCR4	31
1.6.7 CXCR4 dans la domiciliation vers la niche osseuse	31
1.6.8 L'inhibition de CXCR4 par des molécules synthétiques	32
1.6.9 CXCR4 comme marqueur de pronostic	34
<b>1.7.0 Le récepteur CXCR7</b>	<b>34</b>
1.7.1 La structure du récepteur CXCR7	35
1.7.2 L'expression du récepteur CXCR7	36

1.7.3	L'expression de CXCR7 dans le Cancer	37
1.7.4	La signalisation atypique du récepteur CXCR7	37
1.7.5	Le recrutement de la $\beta$ -arrestine par le récepteur CXCR7	38
1.7.6	L'hétérodimérisation du récepteur CXCR7 avec CXCR4	39
1.7.7	Le recyclage de CXCR7 et la régulation du SDF-1	40
1.7.8	Interactions de CXCR7 sur la voie de CXCR4/SDF-1	41
1.7.9	Polémique concernant l'inhibition de CXCR7	42
1.7.10	Polémique concernant le rôle de CXCR7 dans la migration vers SDF-1	43
1.8	<b>Problématique</b>	44
1.9	<b>Projet de recherche</b>	45
<b>2.</b>	<b>MATÉRIEL ET MÉTHODES</b>	47
<b>3.</b>	<b>RÉSULTATS</b>	56
3.1	: Expression de CXCR4 et CXCR7 dans différentes lignées leucémiques	57
3.2	: Localisation de CXCR4 et CXCR7 dans différentes lignées leucémiques	59
3.3	: L'efficacité de la migration varie en fonction de la lignée cellulaire	62
3.4.1	: La quantité des récepteurs est hautement variable	64
3.4.2	: L'efficacité de migration est hautement variable	65
3.5	: Corrélation du potentiel de migration avec le niveau d'expression des récepteurs	67
3.6	: La surexpression du récepteur CXCR7 réduit la migration des cellules transfectées	76
3.7	: La surexpression de CXCR7 module la migration chimiotactique des cellules avoisinantes	82
<b>4.</b>	<b>DISCUSSION</b>	90
4.0	: La présence intracellulaire de CXCR7	93
4.1	: La variabilité dans le patron d'expression de CXCR4 et CXCR7	94
4.2	: Corrélation entre le niveau d'expression de CXCR4, le niveau d'expression de CXCR7 et l'efficacité de la migration	96
4.3	: La meilleure corrélation se trouve entre le ratio CXCR4/CXCR7 et l'efficacité de migration	99
4.4.1	: Conséquences de la surexpression de CXCR4	101
4.4.2	: Conséquences de la surexpression de CXCR7	102
4.4.3	: Effet de la surexpression de CXCR7 sur les cellules avoisinantes	103
4.5	: Mécanismes possibles de la régulation de la chimiotaxie par CXCR7 et CXCR4	105
4.6	: Limitations de l'étude et perspectives	107
<b>5.</b>	<b>CONCLUSION</b>	110
<b>6.</b>	<b>RÉFÉRENCES</b>	112

## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.1 :</b>	<b>Représentation schématique de l'importance de la migration cellulaire</b>	<b>6</b>
<b>Figure 1.2.1 :</b>	<b>Illustration du fonctionnement d'un gradient de migration</b>	<b>7</b>
<b>Figure 1.2.2 :</b>	<b>Illustration des mécanismes de la migration dirigée</b>	<b>8</b>
<b>Figure 1.3 :</b>	<b>Illustration du processus de dissémination des cellules leucémiques dans l'organisme</b>	<b>11</b>
<b>Figure 1.4 :</b>	<b>Représentation schématique des différentes sous-familles des chimiokines</b>	<b>16</b>
<b>Figure 1.5 :</b>	<b>Structure tridimensionnelle commune des chimiokines</b>	<b>19</b>
<b>Figure 1.6 :</b>	<b>Modèle général de la cascade signalétique classique permettant la chimiotaxie par la voie de <math>PIP_2/PIP_3</math></b>	<b>20</b>
<b>Figure 1.7 :</b>	<b>Structure de la chimiokine SDF-1 (CXCL12) déterminée par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire</b>	<b>23</b>
<b>Figure 1.8 :</b>	<b>Charte de la signalisation croisée entre les différentes chimiokines et leurs récepteurs</b>	<b>24</b>
<b>Figure 1.9 :</b>	<b>Représentation schématique des voies de signalisation de CXCR4</b>	<b>30</b>
<b>Figure 1.10 :</b>	<b>Structure de l'AMD 3465, un antagoniste synthétique de CXCR4</b>	<b>33</b>
<b>Figure 2.1 :</b>	<b>Illustration du modèle expérimental</b>	<b>47</b>
<b>Figure 2.2 :</b>	<b>Illustration du stade de différenciation des différentes lignées cellulaires leucémiques analysées dans le projet de recherche</b>	<b>49</b>
<b>Figure 2.3 :</b>	<b>Détection de la phalloïdine dans le milieu intracellulaire des cellules K562 en fonction de la technique de perméabilisation utilisée</b>	<b>53</b>
<b>Figure 3.1 :</b>	<b>Expression de CXCR7 et de CXCR4 au niveau de l'ARN messager dans les cellules leucémiques</b>	<b>58</b>
<b>Figure 3.2 :</b>	<b>Expression et localisation des récepteurs CXCR4 et CXCR7 au niveau des protéines dans différentes lignées leucémiques</b>	<b>61-62</b>
<b>Figure 3.3 :</b>	<b>Efficacité de migration des différentes lignées leucémiques</b>	<b>62</b>
<b>Figure 3.4 :</b>	<b>Variations de l'expression des récepteurs et de l'efficacité de chimiotaxie chez les REH au cours d'une période de 30 jours</b>	<b>66</b>

- Figure 3.5.1:** Corrélation entre le potentiel de migration et l'expression au niveau des protéines des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans les REH\_\_\_\_70-71
- Figure 3.5.2:** Corrélation entre le potentiel de migration et l'expression au niveau des protéines des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans les K562\_\_\_\_74-75
- Figure 3.6:** Effet de la transfection et de la surexpression du plasmide CXCR7-YFP sur la migration des K562 *in-vitro*\_\_\_\_\_79-81
- Figure 3.7.1:** Augmentation de la migration chimiotactique des cellules partageant le même environnement que les K562 surexprimant CXCR7\_\_\_\_82
- Figure 3.7.2:** Effet de l'addition de cellules non-migratoires exprimant CXCR7 ou surexprimant CXCR7 dans le milieu de migration des cellules leucémiques.\_\_\_\_87
- Figure 3.7.3:** La surexpression de CXCR7 affecte les cellules distantes via la dégradation du SDF-1\_\_\_\_\_89



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

7TMR's	Seven transmembrane helix receptors
ADN:	Acide désoxyribonucléique
ADNc:	Acide désoxyribonucléique complémentaire C-terminale
AGM :	Aorte-Gonades-Mesonephros
Akt/PKB :	Protéine kinase B
AMD3100:	AnorMED3100
AMPc:	Adénosine monophosphate cyclique
ANOVA:	Analysis of variance
APC:	Allophycocyanine
BRET:	Bioluminescence Resonance Energy Transfer
BSA:	Bovine Serum Albumin
CEM :	Lignée leucémique (Lymphoblaste T)
CLP :	Cellules lymphoïdes progénitrices
CMP :	Cellules lymphoïdes progénitrices
CSH:	Cellule souche hématopoïétique
CXC :	Cystéine-X-cystéine (ligand ou récepteur)
CXCL12 :	Nom alternatif pour la chimiokine SDF-1
DMEM:	Dulbecco modified eagle medium
DMSO:	Diméthyl sulfoxyde
DSMZ:	The Leibniz Institute DSMZ - German Collection of Microorganisms and Cell Cultures
ERK:	Extracellular signal-regulated kinase
FACS:	Fluorescent-activated cell sorting
GAG:	Glycosaminoglycanes
GAPDH:	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GEF:	Guanine nucleotide exchange factor
GRK:	G-protein receptor kinase
HEK293:	Human embryonic kidney cells
HIF1-a:	Hypoxia inducible factor 1-a
IL-1:	Interleukine 1

ITAC:	Interferon-inducible T-cells alpha chemoattractant
JAK:	Janus Kinase
K562:	Lignée leucémique (progéniteur myéloïde)
LAL:	Leucémie aiguë lymphoïde
LAM:	Leucémie aiguë myéloïde
MAPK :	Mitogen-activated protein kinase
MTOC :	Microtubule organizing center
NF-B :	Nuclear factor of activated B-cell
PBS :	Phosphate buffer saline
PBSF :	Pre-B cell growth stimulating factor
PE :	Phycoerythrine
PI3K:	Phosphoinositol triphosphate kinase
PIP2/3 :	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate/triphosphate
PLCβ:	Phospholipase Cβ
RCPG:	Récepteurs couplés aux protéines G
RDC1:	Receptor Dog cDNA-1
REH:	Lignée leucémique (précurseur de lymphocyte B)
RMN:	Résonnance magnétique nucléaire
RPMI:	Roswell park memorial institute medium
SDF-1:	Stromal cell-derived factor 1
STAT:	Signal transducer and activator of transcription
TNF:	Tumor necrosis factor
VEGF:	Vascular endothelial growth factor
VIH:	Virus d'immunodéficience humaine
VIP :	Vasoactive intestinal peptide
YFP:	Yellow fluorescent protein
WHIM:	Warts, Hypogammaglobulinemia, Infections and Myelokathexis

## REMERCIEMENTS

Je tiens à mentionner ici les personnes qui me sont chères et qui m'ont supporté tout au long de mes études, particulièrement dans le cadre de ce projet de maîtrise complété à l'Université de Montréal.

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de recherche, Dr Nikolaus Heveker, qui m'a supporté tout au long de mes recherches et de mes études post-graduées. Je le remercie pour son écoute, pour ses sages conseils, pour sa patience et surtout pour son amitié. Je le remercie également pour sa disponibilité et pour le temps qu'il a généreusement investi dans ma formation.

Je tiens également à remercier mes collègues et mes compagnons de travail qui m'ont accompagné et servi de modèles durant mes études. Plus particulièrement : Stefanie Gravel, Marie-Ève Pelletier, Nicolas Montpas, Yamina Agnès Berchiche et Guillaume Sylvain-Drolet

Un merci très spécial à mon entourage rapproché, qui m'a aidé et supporté dans ce projet. Merci à Diane Gref et à Sophie Lamothe, qui ont su partager ma passion. Merci à Marie-Hélène Baussard pour son aide dans les moments difficiles. Merci à Marija Manojlovic pour son support, sa compréhension et ses encouragements.

# **1. INTRODUCTION**

### **1.1.0 Les cellules souches hématopoïétiques**

Les cellules souches hématopoïétiques (CSH) sont un sous-type de cellules progénitrices de la moelle osseuse et sont responsables de la formation de toutes les lignées cellulaires sanguines. Elles sont des cellules progénitrices multipotentes qui possèdent la double capacité de pouvoir se diviser de façon asymétrique et symétrique.

Lorsqu'elles se divisent de façon symétrique, les CSH se multiplient et peuvent rapidement augmenter la taille de leurs populations. Cette capacité explique la faisabilité des transplantations de moelle osseuse, durant lesquelles un petit nombre de CSH transplantées parviennent à reconstituer l'ensemble du système hématopoïétique du greffé.

Lorsqu'elles se divisent de façons asymétriques, les CSH produisent deux cellules différentes : une nouvelle CSH qui permet l'autorenouveaulement de la population des CSH et une cellule-sœur qui empruntera la voie de différenciation des cellules lymphoïdes progénitrices (CLP) ou des cellules myéloïdes progénitrices (CMP), qui donneront respectivement naissance aux lignées lymphoïdes (Lymphocyte T, lymphocyte B, lymphocyte NK) et myéloïdes (monocytes, macrophages, neutrophiles, basophiles, éosinophiles, érythrocytes, mégacaryocytes). Ce phénomène permet d'assurer le remplacement continu des cellules sanguines, lesquelles ont une durée de vie limitée [1, 2].

### **1.1.1 Les CSH dans la niche osseuse**

Les CSH survivent et prolifèrent au contact de microenvironnements spécifiques de la moelle osseuse, appelés communément « niches ». Ces niches sont situées principalement dans l'espace périvasculaire de la moelle (niche vasculaire), dans l'endosteum de l'os trabéculaire (niche osteoblastique) et dans certains tissus extramédullaires [3]. Elles sont constituées par des fibroblastes, des ostéoblastes, des adipocytes et des cellules endothéliales qui conditionnent le microenvironnement local. Dans ces endroits, les CSH bénéficient de la protection physique du tissu, mais aussi du support physiologique des cellules avoisinantes [4].

La niche constitue un élément dynamique dans le contrôle de l'hématopoïèse et possède la capacité de provoquer une augmentation rapide de la production de cellules hématopoïétiques en réponse aux besoins de l'organisme [5]. Ce contrôle sur la survie, sur la prolifération et sur la différenciation des CSH s'effectue non seulement par le biais des ostéoblastes et des cellules stromales présentes dans la niche [6, 7], mais aussi par le biais des facteurs de croissances et des cytokines [8, 9] présents dans l'environnement. La chimiokine SDF-1 (CXCL12), en particulier, permet de maintenir les CSH's dans un état quiescent (ou dormant), ce qui joue un rôle important dans le maintien des populations de cellules souches [8-12].

### **1.1.2 La leucémie et les CSH**

La leucémie est un cancer qui affecte les cellules sanguines, plus particulièrement les leucocytes. Dans la leucémie, les précurseurs hématopoïétiques des leucocytes se multiplient de façon anormale dans la moelle osseuse. Cette prolifération incontrôlée se retrouve dans un groupe hétérogène d'hémopathies malignes et est caractérisée par l'expansion clonale, au niveau de la moelle osseuse, de cellules immatures (blastés), appartenant à la lignée myéloïde en cas de leucémie aiguë myéloïde (LAM), et à la lignée lymphoïde en cas de leucémie aiguë lymphoïde (LAL). Généralement, cette pathologie est causée par l'acquisition de mutations dans les gènes des cellules progénitrices hématopoïétiques, qui provoquent non seulement une prolifération excessive, mais aussi une différenciation inappropriée des CSH. [13]. L'invasion de la moelle par la masse cancéreuse provoque éventuellement une inhibition de l'hématopoïèse et le relâchement dans le sang de globules blancs anormaux. Un phénomène qui provoque une insuffisance médullaire.

La leucémie est l'un des cancers dont l'incidence et surtout la mortalité sont les plus élevées. Son incidence est estimée à 5600 nouveaux cas pour l'année 2012, avec un taux de mortalité de près de 50 % [14]. De plus, la leucémie atteint fréquemment les enfants (entre 0 à 14 ans).

Les leucémies aiguës sont traitées par une chimiothérapie intensive qui nécessite généralement une hospitalisation assez longue. Le but est de détruire les cellules anormales (les blastés), mais les CSH « normales », en particulier, y sont aussi

sensibles. Après une cure intensive, le patient ne peut plus renouveler seul ses cellules sanguines. Le malade est alors en phase d'aplasie et nécessite une intervention extérieure pour reconstituer son système hématopoïétique [15].

### **1.2.0 La migration cellulaire dirigée**

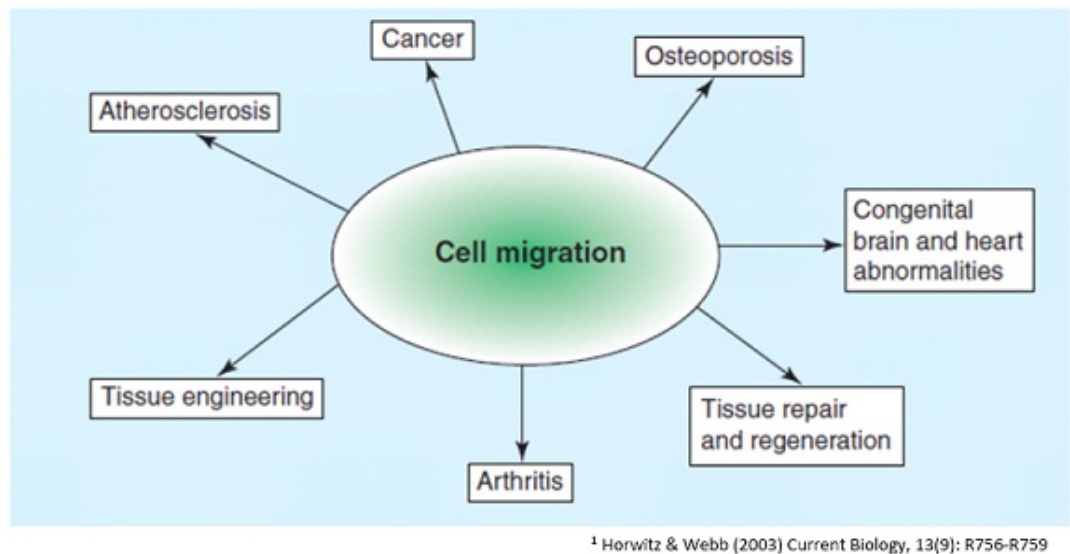
Le processus de migration cellulaire joue un rôle clé dans une grande variété de phénomènes biologiques. Durant le développement embryonnaire par exemple, la migration cellulaire contribue à la morphogenèse, où elle est essentielle aux événements de gastrulation et de neurulation dans la formation du système nerveux [15-17]. Chez l'adulte, la migration cellulaire est essentielle au renouvellement de la peau et de l'intestin, au fonctionnement du système immunitaire et la guérison des blessures. Durant la réponse inflammatoire, les leucocytes migrent jusqu'à la région de la lésion où ils participent à la fonction de phagocytose [18]. Dans la cicatrisation, la migration des fibroblastes et des cellules endothéliales vasculaires permet la guérison des blessures [19].

La direction qu'emprunte cette migration n'est pas laissée au hasard. Elle est plutôt contrôlée par des récepteurs spécifiques, sensibles à la composition de l'environnement [15]. Un bon exemple est le cône de croissance de l'axone en développement, dont les récepteurs spécifiques permettent de migrer en suivant un gradient de concentration vers les cellules-cibles post-synaptiques [20].

Un dérèglement du processus de migration engendre plusieurs problèmes de santé, tels que les maladies inflammatoires chroniques, l'arthrite rhumatoïde, la sclérose en plaques, les maladies vasculaires, l'ostéoporose et des imperfections dans le



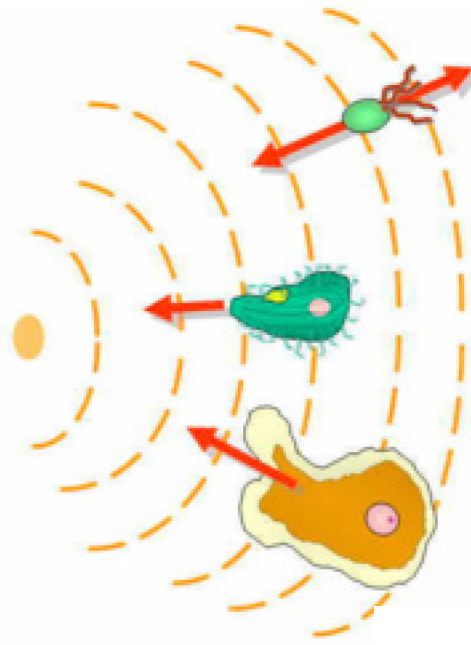
système nerveux [20, 21]. La migration cellulaire joue aussi un rôle dans d'autres pathologies. Par exemple, dans le cancer, les cellules tumorales possèdent la capacité de former des métastases [22]. Dans ce cas, elles migrent à partir du site initial de la tumeur vers le système vasculaire, et empruntent ensuite ce dernier pour atteindre et envahir d'autres tissus dans l'organisme. Ces invasions tumorales ou métastases sont très importantes, car elles constituent la principale cause de mortalité chez les patients cancéreux [23]. Par conséquent, la compréhension des mécanismes moléculaires responsables du contrôle de la motilité cellulaire constitue une étape primordiale pour la mise en place d'approches thérapeutiques efficaces.



**Figure 1.1 Représentation schématique de l'importance de la migration cellulaire.** La migration est centrale à plusieurs processus physiologiques et pathologiques. *(Illustration provenant de Horwitz & Webb, 2003)*

### 1.2.1 Le gradient de migration

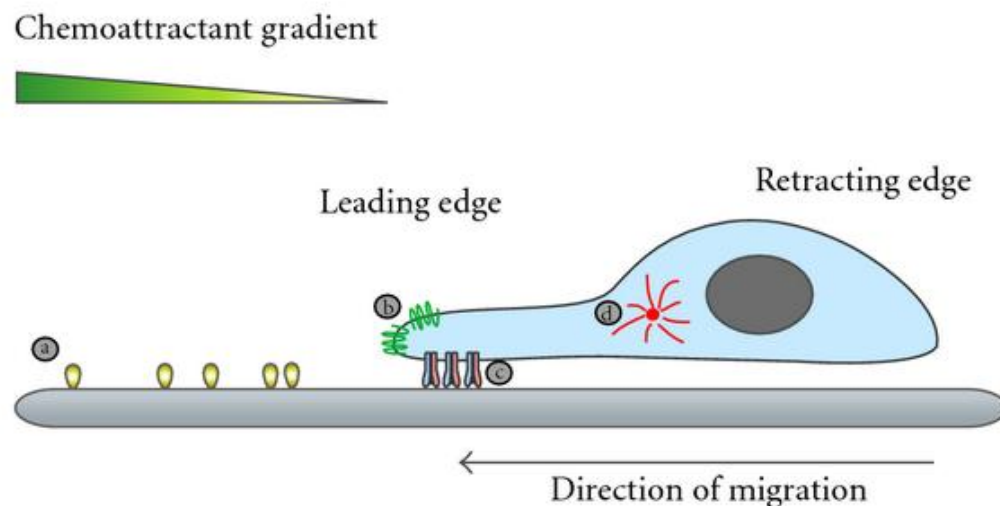
Les cellules métastatiques ne migrent pas aléatoirement dans les tissus. Elles sont attirées par des gradients de molécules qu'on appelle chimio-attractants. On parle alors de chimiotaxie. Ces gradients de concentration sont nécessaires à la migration cellulaire organisée, car les cellules se servent de la différence de concentration dans le gradient pour se diriger, habituellement du point de la concentration la plus faible de chimio-attractants vers le point de la concentration la plus forte. Toutefois, ces gradients ne sont habituellement efficaces que dans une gamme restreinte de concentrations. Aussi, un contrôle précis sur les quantités de molécules chimio-attractantes présentes dans l'environnement est nécessaire pour le maintien d'un gradient de migration efficace.



**Figure 1.2.1 Illustration du fonctionnement d'un gradient de migration.**  
(Illustration provenant de Seiji Fukuda et al, 2011)

### 1.2.2 Les mécanismes moléculaires de la migration cellulaire

De façon générale, la migration est un processus cyclique [24]. Suite à une cascade de signalisation intracellulaire, la cellule se polarise et le cytosquelette se déforme pour créer des protrusions (lamellipodes ou filopodes). Ces prolongements, induits dans la direction du mouvement cellulaire, sont créés par la polymérisation locale de l'actine et stabilisés par des adhésions à la matrice extracellulaire ou aux cellules adjacentes. Ces adhésions sont stabilisées par des récepteurs transmembranaires reliés au cytosquelette d'actine et génèrent la force contractile qui permet le déplacement de la cellule.



**Figure 1.2.2 Illustration des mécanismes de la migration dirigée.** La migration cellulaire en réponse à un gradient de concentration de chimiokines. La cellule se polarise pour changer sa morphologie. Les récepteurs de chimiokines (b) détectent le gradient. Les intégrines (c) forment des adhésions locales sur le front migratoire. Le MTOC (d) se déplace vers le front de migration. (*Illustration provenant de Wang Y. et al, 2007*)

### **1.2.3 La migration des CSH vers la moelle**

Après la naissance, les CSH se retrouvent uniquement dans la moelle osseuse, mais elles ne sont pas originaires de ce tissu. Elles émergent initialement lors du développement embryonnaire au niveau d'une région nommée AGM (pour Aorte-Gonades-Mesonephros). Ces cellules migrent par la suite de façon dirigée vers le foie fœtal, où elles vont se multiplier massivement pour ensuite coloniser le thymus, la rate et enfin inséminer la moelle osseuse [25].

Le processus par lequel les cellules souches hématopoïétiques voyagent pour s'ancrer et s'installer dans la niche est communément appelé le « homing ». Ce phénomène permet non seulement aux CSH fœtales de coloniser la moelle, mais permet également aux CSH adultes qui sont temporairement mobilisés hors de la moelle osseuse d'y retourner avec une grande efficacité [26]. Le homing vers la moelle osseuse est un préalable pour la prolifération constitutive des CSH et possède un rôle très important dans le maintien de l'homéostasie [26-30]. C'est un processus rapide, régulé par plusieurs chimiokines, qui constitue la première étape dans toutes les transplantations cliniques de cellules souches [28, 31, 32].

### **1.2.4 La mobilisation des CSH de la moelle**

Les CSH résident normalement dans la moelle osseuse, où elles se trouvent ancrées parmi d'autres cellules souches et existent sous un état quiescent, mais elles peuvent être déplacées ou mobilisées dans la circulation sanguine en réponse à des signaux spécifiques mettant en jeu une variété de protéinases, de cytokines, de facteurs de croissance et des récepteurs membranaires, un processus communément

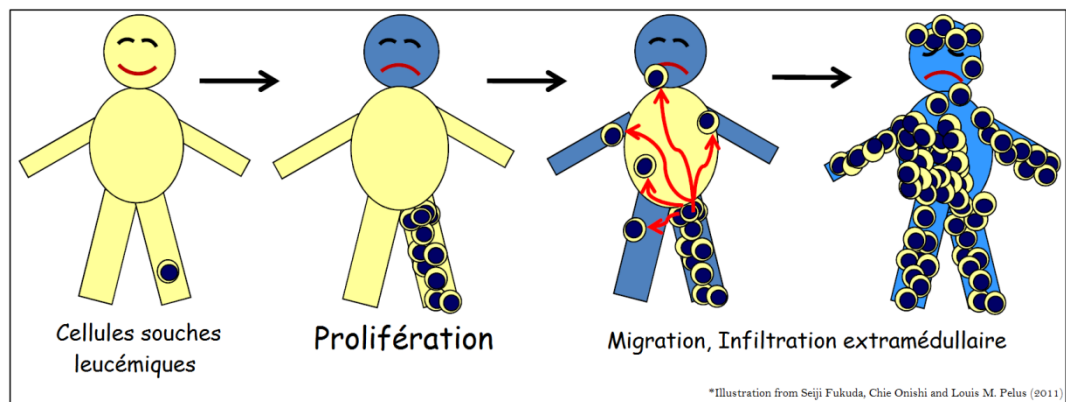
appelé « mobilisation ». Ce processus est d'une importance vitale pour l'attraction des CSH vers le sang et les tissus périphériques. La régulation de ce phénomène implique des facteurs de croissances et certaines hormones, mais passe principalement par les signaux spécialisés associés à la chimiotaxie [33, 34], particulièrement l'axe SDF-1/CXCR4 [35, 36].

### **1.2.5 La dissémination des cellules leucémiques dans l'organisme**

Un des indicateurs majeurs de la sévérité du pronostic chez les patients de la leucémie est l'infiltration extramédullaire et la dissémination des cellules leucémiques dans l'organisme. En effet, les différents sites de la niche hématopoïétique ne sont pas en contact direct dans l'organisme. Les cellules leucémiques dérivées d'un unique clone doivent donc pénétrer dans la circulation périphérique et voyager dans le corps pour envahir différents sites secondaires avant que leur multiplication ne provoque une inhibition significative de la production des cellules sanguines normales [37].

De plus, les complications majeures fréquentes qui mènent à un mauvais pronostic sont généralement reliés à la dissémination et l'invasion des cellules leucémiques dans des sites secondaires. Ceci inclut l'infiltration de cellules leucémiques dans le système nerveux central [38] et la dissémination vers d'autres sites extramédullaires, incluant la peau et les organes viscéraux, toutes des complications fréquentes qui mènent à un mauvais pronostic et qui augmentent les chances de rechutes [39].

Aussi, la dissémination des cellules leucémiques doit être considérée comme une étape cruciale dans la progression des leucémies (**Figure 1.3**). Les mécanismes qui sont responsables de la migration dirigée et de l’envahissement de la niche osseuse par les cellules leucémiques sont donc des sujets d’étude de la plus haute importance pour l’avancée des thérapies et des modèles diagnostiques.



**Figure 1.3 Illustration du processus de dissémination des cellules leucémiques dans l’organisme.** (*Illustration provenant de Seiji Fukuda et al, 2011*)

### 1.2.6 Le homing et les greffes de moelle osseuse dans la leucémie

Une greffe de moelle osseuse peut être utilisée pour régénérer le système hématopoïétique des patients suite à la destruction des cellules progénitrices de la moelle par les traitements anti-cancéreux administrés pour contrer la leucémie. Cette greffe consiste en une transfusion de CSH, lesquelles migreront ensuite rapidement jusqu’à la moelle osseuse et s’installeront dans la niche pour reconstituer les populations normales de CSH grâce au processus de homing. Ce phénomène est rendu possible par des gradients de chimiokines et plus particulièrement par les interactions entre SDF-1 et CXCR4.

Toutefois, la capacité que possèdent les CSH de voyager sélectivement dans la circulation vers des environnements protecteurs particulièrement propices à la survie cellulaire (la niche) sont les mêmes qui permettent aux cellules leucémiques de se propager dans l'organisme, d'envahir la niche et de se protéger des traitements chimiothérapeutiques [40].

### **1.2.7 Le rôle de la chimiotaxie dans les métastases cancéreuses**

Dans presque tous les différents types de cancer, il arrive que des cellules cancéreuses se détachent de la tumeur primaire pour se déplacer dans le réseau sanguin et migrent à l'intérieur des tissus pour aller envahir d'autres régions de l'organisme. On parle alors de métastases, qui constituent une phase importante du développement du cancer. Or, les cellules mises en jeu dans ce processus migrent par chimiotaxie, et des études précédentes [41] ont montré que plus les cellules sont métastatiques, plus leur vitesse de migration est importante. Il est donc intéressant d'étudier l'efficacité chimiotactique des cellules cancéreuses, dans le but de pouvoir mieux prédire l'apparition des métastases. Toutefois, la métastase cancéreuse est un processus complexe qui implique un grand nombre d'évènements, et plusieurs signaux provenant de la tumeur, des cellules stromales, de la matrice extracellulaire et de facteurs de croissance solubles qui peuvent tous influencé le comportement des cellules cancéreuses. Ainsi, bien que la chimiotaxie soit un élément indispensable du comportement métastatique des cellules, il est important de comprendre qu'il n'a jamais été prouvé que l'efficacité de migration équivaut au risque ou à la vitesse d'apparition des métastases.

### **1.3.0 Les cytokines**

Les cytokines sont des petites molécules solubles qui servent d'hormones dans la modulation du système immunitaire. Ces médiateurs peptidiques sont sécrétés par une grande variété de cellules leucocytaires et non-leucocytaires en réponse aux stimuli. Elles peuvent agir de façon autocrine (sur les cellules qui les ont excrétées) et de façon paracrine (sur des cellules distantes) par le biais de récepteurs spécifiques [42]. Elles servent ainsi à la communication intercellulaire, et permettent la régulation de l'activité et de la fonction de plusieurs types de cellules sur de grandes distances. Cette qualité rend les cytokines nécessaires pour le développement et le maintien de la réponse inflammatoire [18]. Les cytokines régulent également l'intensité et la durée de la réponse immunitaire en stimulant ou en inhibant la prolifération, l'activation et la différenciation de différentes cellules, ainsi qu'en régulant la sécrétion d'anticorps. Elles sont capables d'actions dites pléiotropiques, c'est-à-dire qu'une même cytokine peut produire des effets biologiques différents sur différentes cellules réceptrices. Mais il est également possible que plusieurs cytokines différentes produisent la même réaction dans une cellule-cible (actions redondantes) [42]. Aussi, la famille des cytokines inclut de nombreuses interleukines (IL), facteurs de croissance et facteurs hématopoïétiques.

#### **1.3.1 Les chimiokines**

Les chimiokines sont une famille de petites cytokines, de protéines sécrétées par les cellules qui se retrouvent chez presque tous les vertébrés (ainsi que dans plusieurs microorganismes) [26, 43]. Plus de 40 chimiokines différentes ont été découvertes



jusqu'à présent chez l'humain [44]. Elles sont constituées de 70 à 130 acides aminés. Leurs noms, une contraction du terme « Chemoattractant Cytokines » dérive de leurs habiletés à induire directement la chimiotaxie dans les cellules réceptives [26]. Ce sont, dans les faits, des cytokines chimiotactiques.

Ces chimiokines sont responsables de la mobilité orientée (chimiotaxie) des cellules dans l'organisme. Elles accomplissent généralement leurs fonctions en formant un gradient de concentration [27]. Les chimiokines activent des récepteurs couplés aux protéines G, ce qui résulte en la migration des cellules vers les tissus (ou compartiments) appropriés [28]. Cette mobilité dirigée des cellules est essentielle au développement embryonnaire et à la surveillance immunitaire [21], en plus d'être nécessaire au bon fonctionnement de la réponse inflammatoire [29-31, 45]

En plus de la migration dirigée, le rôle des chimiokines consiste fréquemment à promouvoir l'accumulation et la rétention des cellules migratoires à la source de la production de chimiokines [32]. Aussi, certaines chimiokines sont produites et secrétées de façon constitutive sans qu'une stimulation spécifique ne soit nécessaire. Ces chimiokines homéostatiques peuvent, par exemple, diriger le trafic des lymphocytes dans les tissus lymphoïdes. Elles peuvent également agir dans la localisation des cellules T ou B présentatrices d'antigènes [33]. Plusieurs autres chimiokines sont considérées inflammatoires et sont uniquement produites par les cellules lors d'une infection, ou en réponse à un stimulus. Par exemple, certaines chimiokines sont relâchées en réponse à la présence de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 et le TNF [43]. Leur rôle est alors d'induire la

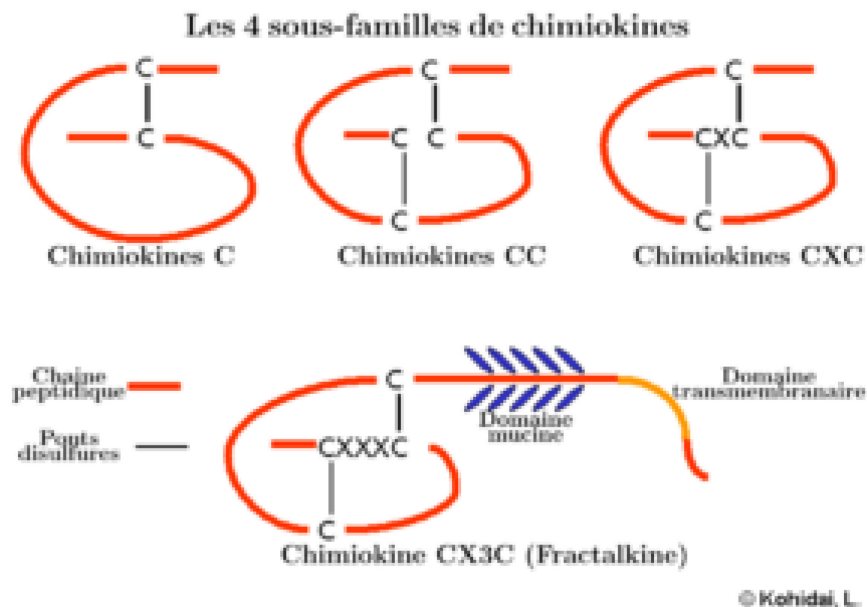
migration dirigée des leucocytes, et de les guider vers le site d'infection ou de lésion. [19, 29, 33]

Les chimiokines peuvent aussi avoir plusieurs fonctions secondaires. Par exemple, la présence de certaines chimiokines inflammatoires peut activer la réponse immunitaire des cellules et promouvoir la guérison des blessures [28]. De plus, certaines chimiokines agissent dans la régulation du processus d'angiogenèse [34]. D'autres agissent dans le contrôle de la survie et de la prolifération cellulaire [35]. Conséquemment, les chimiokines et leurs récepteurs sont impliqués dans de nombreuses pathologies telles que les désordres inflammatoires, les désordres du développement embryonnaire, les différents types de cancers et les métastases cancéreuses [36, 46, 47]. Cela fait des chimiokines un sujet d'étude privilégié et une cible thérapeutique très prometteuse [31, 48, 49]. La résolution de leur structure et de leur fonctionnement est donc d'une importance capitale. La compréhension de leur mécanisme d'action ouvre la porte à la création de composés permettant la modulation de leur activité. Par exemple, le Maraviroc (2007) et le Mozobil (2009) sont deux agents thérapeutiques, récemment approuvés par la FDA (*Food and drug administration*), qui ont été développés pour cibler les récepteurs de chimiokines CCR5 et CXCR4, respectivement [31, 50].

### **1.3.2 La structure des chimiokines**

La structure primaire des chimiokines est définie par quatre résidus cystéines conservés. Ces résidus cystéines sont importants, car ils permettent la formation de ponts disulfides essentiels au maintien de la forme tridimensionnelle de type « clef

grecque » de l'extrémité N-terminale, un segment de 6 à 10 acides aminés qui est crucial pour l'activité des chimiokines [51]. Dans ce modèle, la première cystéine forme un lien covalent avec la troisième, et la seconde cystéine forme un lien avec la quatrième. Aussi, la nomenclature des chimiokines, établie par l'union internationale de pharmacologie [52], est habituellement basée sur le motif formé par les quatre résidus cystéines, ce qui permet de systématiser la séparation des cytokines chimiotactiques en quatre sous-familles distinctes (**Figure 1.4**). Les chimiokines qui possèdent un acide aminé entre leurs deux premières cystéines sont classifiées en tant que 'CXC', alors que celles dont les résidus cystéines sont adjacents sont classifiées 'CC'. La famille des 'CX3C' (Fractalines), plus rares, est formée par les chimiokines qui possèdent trois résidus entre leurs cystéines [53]. Selon cette nomenclature, la chimiokine SDF-1 devient CXCL12 ('X' pour l'acide aminé séparant les deux premières cystéines conservées, 'L' pour ligand).



**Figure 1.4 Représentation schématique des différentes sous-familles des chimiokines.** (Figure créée par Kohida et al, 2007)

La structure secondaire des chimiokines consiste en une extrémité N-terminale allongée, suivie des deux premiers résidus cystéine et d'une boucle d'une longueur approximative de 10 résidus appelée la boucle N (figure 1.5). Cette boucle est importante car sa flexibilité permet la liaison de la chimiokine [54]. S'en suit une alternance d'hélices alpha et de feuillets bêta, séparés par des boucles appelées les boucles 30s, 40s et 50s, relativement au nombre de résidus qui les précèdent. La structure tridimensionnelle demeure pratiquement identique parmi toutes les chimiokines. Le brin qui suit la boucle N est replié par trois boucles flexibles de 3 ou 4 résidus de façon antiparallèle pour former un feuillet bêta, suivi d'une hélice alpha qui connecte la boucle 50s à l'extrémité C-terminale de la chimiokine. Le cœur de la structure des chimiokines étant stabilisé par les ponts disulphides entre les résidus cystéines conservés et par des interactions hydrophobiques.

#### **1.4.0 Les récepteurs couplés aux protéines G**

Les chimiokines agissent en se liant à des récepteurs à 7 passages transmembranaires couplés aux protéines G (RCPGs ou 7TMRs), la famille de récepteurs la plus importante dans la transduction du signal depuis la surface cellulaire [52]. Le rôle de ces récepteurs, constitués de sept domaines transmembranaires hydrophobiques, est de détecter la présence de ligands à l'extérieur de la cellule pour ensuite activer la transduction de signaux intracellulaires via l'activation d'une protéine G hétérodimérique [55], laquelle provoquera une cascade signalétique qui induira les mécanismes de la réponse cellulaire [56].

Étant donné leurs implications dans de nombreuses pathologies, telles que le cancer, les maladies auto-immunes ainsi que les maladies inflammatoires (athérosclérose), les RCPGs représentent des cibles pharmacologiques importantes [57]. De ce fait, ils constituent la cible de près de 40 % des molécules thérapeutiques modernes [58, 59].

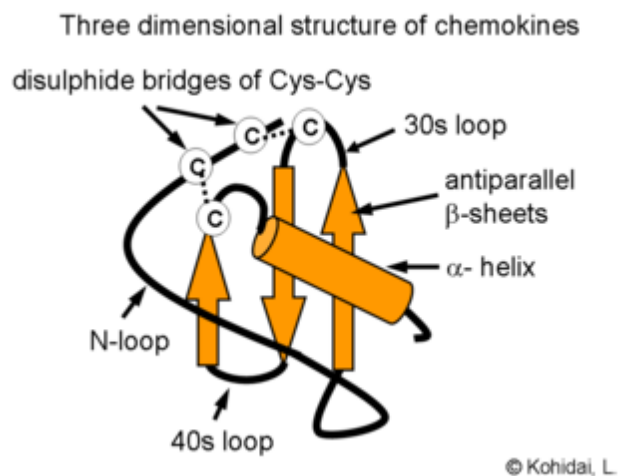
Il y a deux voies signalétiques principales impliquant les récepteurs couplés aux protéines G : la voie de l'AMP cyclique et la voie du phosphatidylinositol [60, 61]. Quand un ligand lie le récepteur couplé aux protéines G, il provoque un changement de conformation dans la structure du récepteur, ce qui lui permet d'agir en tant que « guanine nucléotide exchange factor » (GEF) au niveau de sa face cytoplasmique. Le récepteur peut alors activer une protéine G avec laquelle il s'est associé en échangeant la guanine di-phosphate avec laquelle il est lié pour une guanine triphosphate. Une sous-unité (sous-unité alpha) de la protéine G activée va alors se dissocier de la protéine pour provoquer la transduction du signal au niveau intracellulaire, le plus souvent par le biais d'une cascade enzymatique qui provoque des réponses variées, telles que la mobilisation du calcium ou l'activation de l'adénylate cyclase [62, 63]. Dans les deux cas, l'activation du récepteur déclenche subséquemment l'endocytose du récepteur, lequel internalise ensuite pour être recyclé plus tard à la surface. Ce mécanisme mène éventuellement un état stable où une proportion significative des récepteurs se trouve relocalisés à l'intérieur des cellules [64].

### 1.4.1 Les récepteurs de chimiokines

Les récepteurs de chimiokines font partis de la première de trois classes de 7TMRs distinctes. Cette classe, la classe A, rassemble les récepteurs de chimiokines avec ceux de la rhodopsine, du  $\beta$ 2- adrénergique, des dopamines et des opioïdes [65].

Les récepteurs de chimiokines disposent d'une partie N-terminale acide, d'une courte troisième boucle intracellulaire basique, d'un motif DRYLAI hautement conservé au niveau de la deuxième boucle intracellulaire [66, 67] et d'un résidu cystéine dans chacune des 4 boucles extracellulaires servant à former des ponts disulfure, dans le but d'assurer un bon repliement de la protéine en plus d'assurer une meilleure interaction avec le ligand [67, 68].

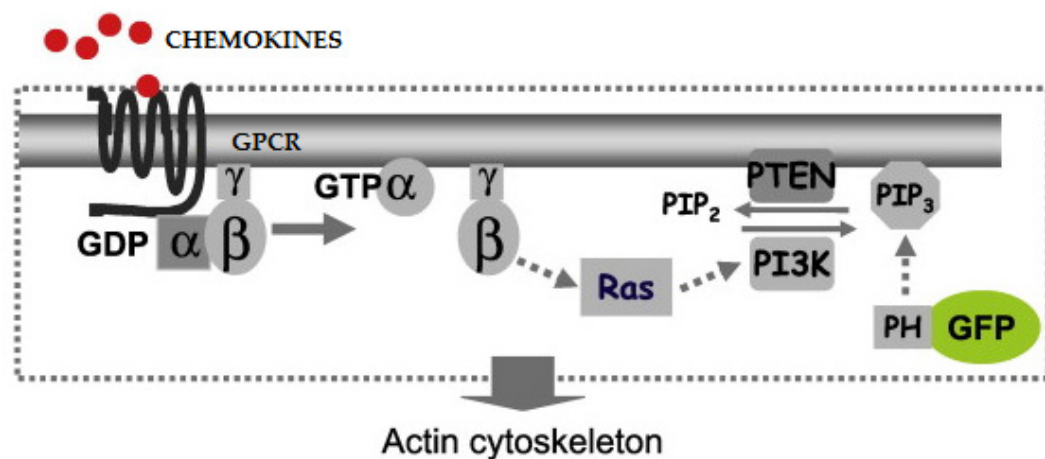
Aussi, les récepteurs de chimiokines possèdent la même classification que les chimiokines elles-mêmes, c'est-à-dire que leur appellation dépend de l'arrangement des résidus cystéines conservés de leurs ligands, suivi de la lettre R, pour récepteur. De ce fait, le récepteur principal pour le CXCL12 se nomme CXCR4.



**Figure 1.5 Structure tridimensionnelle commune des chimiokines.**  
(Figure créée par Kohida et al, 2007)

### 1.4.2 La signalisation générale empruntée par les chimiokines

Plusieurs des éléments généraux de la signalisation chimiotactique peuvent être représentés par un modèle de base, établi à l'origine par l'observation du modèle *D.discoideum*: Au site de l'inflammation, les cytokines pro-inflammatoires provoquent la sécrétion de chimiokines. Ces chimiokines se lient aux glycosaminoglycanes (GAG) à la surface de l'endothélium du site inflammatoire, et établissent par leur diffusion un gradient de concentration [70]. Cette concentration localisée de chimiokines donne alors un signal directionnel aux cellules. Le chimioattractant (le gradient de chimiokines) qui se trouve dans le milieu extracellulaire est ensuite détecté par des récepteurs associés aux protéines G (**Figure 1.6**) situés à la surface des cellules motiles. La liaison de la chimiokine au récepteur induit alors la dissociation de la protéine G hétérotrimérique en deux sous-unités,  $G\alpha$  et  $G\beta\gamma$ . Ce qui suit dépend ensuite du modèle observé. Bien entendu, différentes cellules migratoires utilisent différentes voies signalétiques et différentes chimiokines. Certaines font exception à ce modèle général.



**Figure 1.6 Modèle général de la cascade signalétique classique permettant la chimiotaxie par la voie de PIP<sub>2</sub>/PIP<sub>3</sub>.** La sous-unité Gβγ induit la protéine Ras, laquelle induit directement PI3K et provoque la conversion des phospholipides membranaires PIP<sub>2</sub> en PIP<sub>3</sub>, un processus régulé par la GTPase RhoA [70-74]. Une fois généré, le PIP<sub>3</sub> module la polarisation intracellulaire en recrutant plusieurs protéines régulatrices de la polymérisation de l'actine (CRAC, Akt/PKB et la GTPase Rac). La protéine Rac activée (ainsi que Cdc42) interagissent ensuite avec le complexe WASP/SCAR pour polariser l'actine au site de migration [74, 75]. *(Figure tirée et modifiée de Tian et al, 2008)*

### **1.5.0 La chimiokine SDF-1 (CXCL12)**

Le SDF-1 (stromal cell derived factor-1) est une petite cytokine provenant d'une famille dont les membres activent les leucocytes. Autrefois appelé pre-B cell growth stimulating factor (PBSF), il est désormais référé en tant que CXCL12 (selon la classification standardisée), et fait partie de la sous-catégorie des chimiokines à motif CXC. Cette sous-catégorie, la plus commune parmi les chimiokines, est généralement celle qui est la plus impliquée dans la chimiotaxie [76], l'angiogenèse [76, 77] et l'incorporation de cellules progénitrices endothéliales dans les vaisseaux en formation [78].

Le SDF-1 est fortement chimiotactique pour les lymphocytes [79]. Durant l'embryogénèse, il dirige la migration des cellules hématopoïétiques en provenance du foie fœtal vers la moelle osseuse, et régule la formation des principaux vaisseaux sanguins [80]. Aussi, la mutation double-négative pour le gène CXCL12 chez la souris est fatale durant le développement, ou dans certains cas, durant la première heure qui suit la naissance [81].



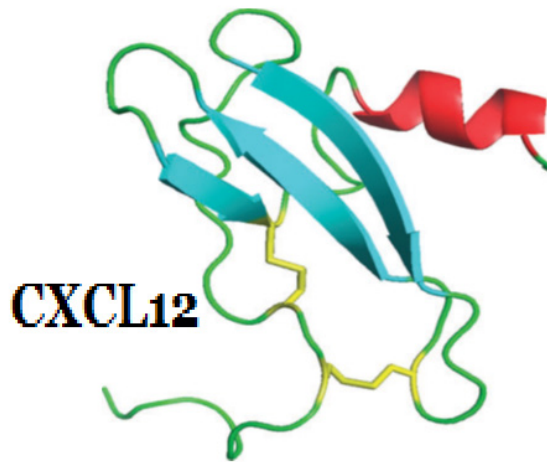
### **1.5.1 L'implication de la chimiokine SDF-1 dans le cancer**

Dans la vie adulte, le SDF-1 joue un rôle important dans l'angiogenèse [77] et permet, entre autres, le recrutement des cellules progénitrices endothéliales via ses interactions avec le récepteur CXCR4 [82]. Ces fonctions font de SDF-1 un facteur très important dans la carcinogénèse et la néovascularisation reliée à la croissance des tumeurs cancéreuses [83, 84]. Le SDF-1 joue également un rôle primordial dans la métastase tumorale [84, 85]. En effet, il a été démontré que les cellules cancéreuses métastatiques qui expriment le récepteur CXCR4 sont attirées vers les cibles qui sécrètent la chimiokine CXCL12 [86]. L'implication de SDF-1 dans le cancer est telle que des équipes de recherches arrivent même à corrélér inversement son niveau d'expression avec la qualité du pronostic clinique [87, 88]. Toutefois, les résultats de recherche portant sur les conséquences de la surexpression et sécrétion de CXCL12 dans le cancer restent contradictoires. En effet, certains groupes d'études rapportent qu'une forte expression de CXCL12 a contribué à un risque réduit de métastases et que son élimination a augmenté le potentiel métastatique invasif des cancers [89, 90].

### **1.5.2 La structure et la liaison de la chimiokine SDF-1**

La structure du SDF-1 a été déterminée par cristallographie aux rayons X [91] ainsi que par spectroscopie par résonance magnétique nucléaire (RMN) [92] et correspond au modèle standard pour les chimiokines CXC. Il contient trois feuillets bêta, repliés sur eux-mêmes de façon antiparallèle, suivie d'une hélice alpha (**figure 1.7**).

Lors de la liaison de SDF-1 avec son récepteur, les premiers 8 résidus de l'extrémité N-terminale sont particulièrement importants, mais seules la Lysine 1 et la Proline 2 sont absolument essentiels à l'activation du récepteur. En effet, la délétion de l'un des deux résidus mène à un ligand fortement antagoniste [91]. La chimiokine possède aussi un second site d'interaction dans la boucle constituée des résidus 12 à 17, et une séquence d'acides aminés fortement chargée positivement (Lys24, His25, Lys27 et Arg41) qui sont nécessaires au maintien des forces électrostatiques qui stabilisent l'interaction avec le récepteur.

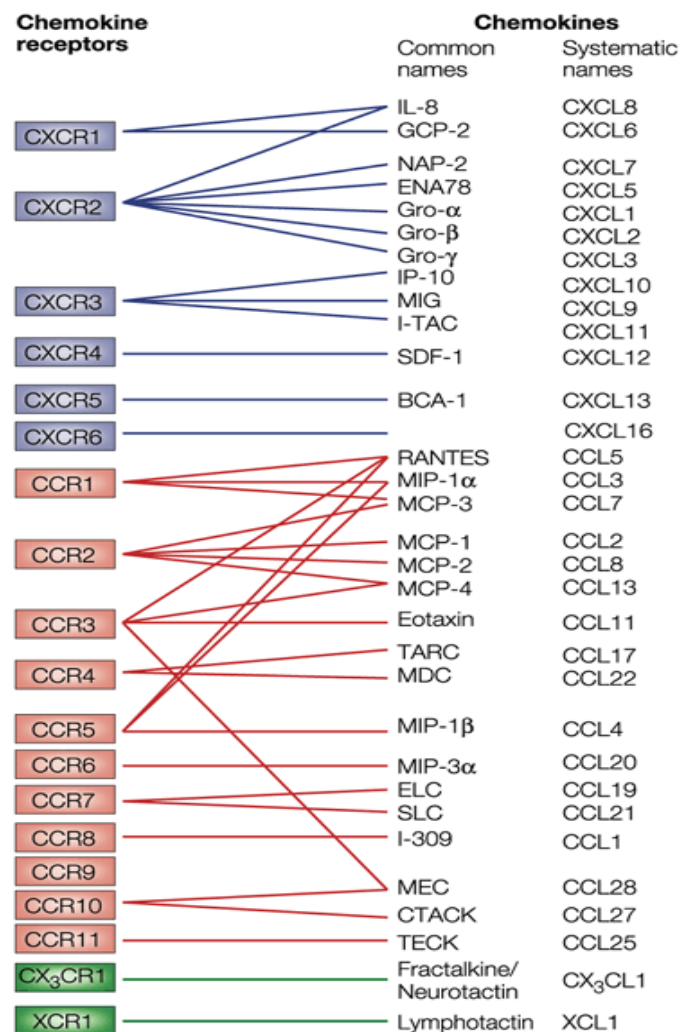


**Figure 1.7 Structure de la chimiokine CXCL12 (SDF-1) déterminée par spectroscopie par résonnance magnétique nucléaire.** Les deux ponts disulfides, Cys11-Cys50 et Cys9-Cys-34, sont surlignés en jaune. (*Figure créée par Crump et al, 1997*)

### 1.5.3 La relation ligand/récepteur inhabituelle de SDF-1

Le SDF-1 a longtemps été considéré différent des autres chimiokines en ce qui a trait à sa relation envers son récepteur. Ceci est dû au fait qu'il est habituel de voir différentes chimiokines partager les mêmes récepteurs et entrer en compétition pour leurs liaisons/activations [92]. De la même façon, les chimiokines ont rarement un

récepteur unique, et peuvent généralement se lier à plusieurs récepteurs différents (**Figure 1.8**). Par opposition, jusqu'à la découverte récente du CXCR7, le SDF-1 était considéré comme le ligand biologique unique de CXCR4. Aussi, contrairement aux chimiokines de la classe CXC qui sont transcrites à partir d'un gène sur le chromosome 4, le gène codant pour le SDF-1 se situe sur le chromosome 10 [93].



Nature Reviews | Immunology

**Figure 1.8** Charte de la signalisation croisée entre les différentes chimiokines et leurs récepteurs (préalablement à la découverte du CXCR7. (Figure provenant de Amanda E. I. et Proudfoot, *Nature Reviews Immunology* , 2002)

## **1.6.0 Le récepteur CXCR4**

Le récepteur de chimiokines CXCR4 est un récepteur à 7 domaines transmembranaires de 352 acides aminés. Découvert en 1993 par clonage, il est initialement considéré comme un récepteur orphelin et adopte le nom de 'Fusine'. D'abord mis en cause dans la pénétration du virus VIH-1 et VIH-2 dans les lymphocytes T CD4+, ce n'est que 3 ans plus tard, en 1996, qu'il est associé à son ligand biologique, la chimiokine SDF-1, est associé à la chimiotaxie, et prend le nom de CXCR4 [94, 95]. Rapidement, le couple CXCR4-SDF-1 a été impliqué dans une multitude de phénotypes tant physiologiques que pathologiques, et CXCR4 devient l'un des récepteurs de chimiokines les plus étudiés [96].

### **1.6.1 Expression et rôle de CXCR4**

Comme on peut s'y attendre d'un récepteur de chimiokines, on retrouve CXCR4 à la surface des cellules hématopoïétiques. Aussi, la quasi-totalité des cellules motiles qui expriment CXCR4 sont attirées par chimiotaxie vers son ligand, SDF-1 [30]. Ceci inclut la majorité des lymphocytes T, tous les lymphocytes B, les cellules NK, les neutrophiles, les monocytes et même les cellules progénitrices de la moelle CD34+ [97]. CXCR4 joue donc un rôle majeur dans le recrutement de ces cellules aux sites de l'inflammation et dans la domiciliation (homing), mais aussi dans l'ancrage ou le relâchement des cellules progénitrices abritées dans les microenvironnements du foie et de la moelle osseuse. En effet, les souris doubles-négatives pour CXCR4 sont incapables de retenir leurs lymphocytes pro-B dans leurs organes hématopoïétiques [16, 98]. La force de cette chimiotaxie spécifique

peut être modulée par le niveau d'expression de CXCR4. En effet, certaines molécules (telles que les cytokines IL-4 ou IL-10) modulent la migration en augmentant ou diminuant respectivement l'expression de CXCR4 sur les lymphocytes T [99]. L'activité du CXCR4 peut également être modulée par des antagonistes qui bloquent l'activation ou la signalisation du récepteur [100, 101].

On retrouve aussi l'expression du récepteur CXCR4 dans plusieurs cellules non-hématopoïétiques et dans de nombreux types de tissus non-motiles, tel que sur des cellules épithéliales [102], sur des cellules endothéliales vasculaires et sur des neurones du système nerveux central et périphérique [103]. De plus, il a été démontré que le couple SDF-1/CXCR4 régulaient aussi plusieurs processus biologiques essentiels, tels que le développement du cœur, le développement des neurones, l'organogénèse, la mobilisation des cellules souches, la néovascularisation et la tumorigénèse [16, 98, 104].

Les souris doubles négatives pour le gène de CXCR4 subissent les mêmes effets que celles déficientes pour le SDF-1, et meurent *in utero* ou très rapidement après la naissance d'une malformation de la valve cardiaque et du septum ventriculaire. Cette similarité, entre les rôles de SDF-1 et de CXCR4, s'explique par la relation étroite qu'entretient le récepteur avec son ligand. En effet, contrairement à la plupart des autres récepteurs, qui peuvent lier plusieurs types de chimiokines, SDF-1 est le seul ligand endogène et agoniste pour CXCR4.

### **1.6.2 Pathologies impliquant CXCR4**

CXCR4 est un récepteur qui est impliqué dans plusieurs pathologies chez l'humain.

Par exemple, le syndrome de WHIM est une maladie immunitaire causée par des mutations hétérozygotes dans le gène de CXCR4 qui provoquent une activation constitutive du récepteur CXCR4 en empêchant sa désensibilisation et son recyclage par l'internalisation [105]. La conséquence de l'accumulation de récepteurs CXCR4 constitutivement actifs à la surface cellulaire est un potentiel chimiotactique accru [106] et une forte rétention des neutrophiles dans la moelle osseuse, ce qui provoque une neutropénie sévère.

Le récepteur CXCR4 est également impliqué dans les cancers [34, 35]. En effet, CXCR4 se retrouve exprimé dans plus de 20 types de cancers distincts [107], et représente le récepteur de chimiokine le plus souvent surexprimé sur les cellules cancéreuses [108, 109]. Dans certains cas, la surexpression de CXCR4 a été même observée dans des types de tissus cancéreux qui n'expriment pas (ou peu) ce récepteur à l'état saint [110]. Toutefois, la surexpression de CXCR4 peut être partiellement expliquée par les conditions tumorales, qui sont riches en facteurs induit par l'hypoxie (HIF1- $\alpha$ ), en facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF) et en NF- $\kappa$ B, qui sont tous des éléments qui provoquent l'expression cellulaire de CXCR4 et de SDF-1 [97, 111].

Un des rôles importants du couple CXCR4-SDF1 dans les cancers concerne la dissémination des métastases [110, 112]. En effet, la dissémination métastatique est un processus qui comprend plusieurs étapes qui impliquent chacune le récepteur CXCR4, c'est-à-dire l'angiogenèse, l'invasion à travers la matrice extracellulaire, la traversée de la membrane vasculaire basale, l'entrée dans la circulation sanguine et le voyage vers de nouveaux sites métastatiques à des organes spécifiques [104].

Aussi, dans le cas du cancer du sein, les cellules surexprimant CXCR4 vont préférentiellement migrer vers les organes secondaires présentant les plus fortes concentrations de SDF-1: le foie, les poumons, la moelle osseuse, le cerveau et les ganglions [110]. De ce fait, CXCR4 est une cible très importante dans le développement thérapeutique contre le cancer.

### **1.6.3 La structure du récepteur CXCR4**

CXCR4 est un récepteur transmembranaire de 352 acides aminés qui suit le modèle général des RCPG, comprend une partie N-terminale extracellulaire de 39 acides aminés et d'une extrémité C-terminale cytoplasmique de 45 acides aminés [113]. Le repliement principal du récepteur consiste en un cylindre de 7 hélices alpha transmembranaires communes aux RCPG, sauf que les parties extracellulaires des hélices alpha tendent à s'incurver vers le centre de l'axe, significativement plus (par 9 Angströms) que chez un récepteur typique comme le  $\beta_2$ AR. Autre particularité : l'hélice alpha II se contorsionne d'une façon beaucoup plus prononcée que la normale au niveau de la proline 92, ce qui cause une déformation sur la boucle extracellulaire correspondante [113]. De plus, l'hélice alpha VII est significativement plus longue (près de deux tours) que dans les RCPG typiques, ce qui permet au résidu Cys274 de former un pont disulphide avec le résidu Cys28 dans la partie N-terminale du récepteur [114].

### **1.6.4 L'activation du récepteur CXCR4**

Suite à la liaison de son ligand SDF-1, le récepteur induit le déplacement orienté des cellules dans l'organisme en plusieurs étapes, par une cascade signalétique

complexe (65). Lors de l'interaction initiale, les résidus 12 à 17 de la chimiokine vont interagir avec les résidus 2 à 36 du récepteur, ce qui provoque un changement conformationnel et augmente l'affinité des acides aminés 1-8 de la chimiokine avec les résidus Asp187 et Glu268 des boucles extracellulaires de CXCR4 [115-117]. Le motif DRY de CXCR4, un pivot important hautement conservé, permet alors les changements de conformation nécessaires à l'activation du récepteur [118, 119].

### **1.6.5 La cascade de signalisation du récepteur CXCR4**

Ayant adopté sa forme active, CXCR4 interagit avec les protéines G hétérotrimériques (Figure 1.9). La signalisation passe soit via l'activation des protéines G  $\alpha$ -i [120] et l'inhibition de l'adénylate cyclase, ce qui diminue la production de l'AMP cyclique et active les tyrosines kinases de type Src, ou alors passe par l'activation de la protéine G  $\alpha$ -g, laquelle produit une cascade signalétique par sa modulation du relâchement calcique.

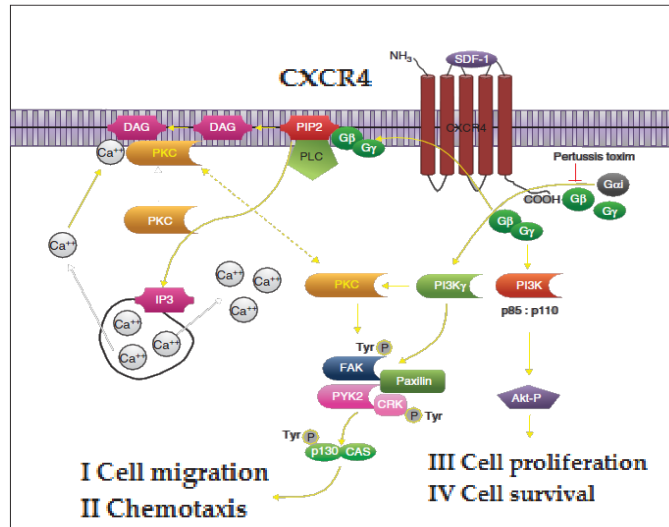
Dans les deux cas, le dimère  $G\beta\gamma$  libre active ensuite la phospholipase  $C\beta$  (PLC $\beta$ ), (RAK) ainsi que la phosphatidylinositol 3'-kinase (PI3K), des cibles qui sont importantes dans la chimiotaxie des lymphocytes, notamment par la modulation de la contractilité de la myosine, mais aussi dans la régulation de l'adhésion cellulaire et dans le contrôle de l'expression de plusieurs gènes en liens avec la migration dirigée ([80, 121-123]).

Le récepteur CXCR4 est aussi capable de signaler de façon indépendante des protéines G. En effet, il a été démontré que l'activation du récepteur provoque l'association et l'activation de JAK2 et JAK3, lesquelles permettent le recrutement



et la phosphorylation de plusieurs membres de la famille STAT [124]. De plus, la liaison du ligand SDF-1 provoque des interactions entre le récepteur CXCR4 et différentes GRKs, soit GRK2, GRK3, GRK5 et GRK6.

Ces interactions sont nécessaires pour le recyclage rapide de CXCR4. En effet, c'est la phosphorylation de la queue C-terminale de CXCR4 par GRK3 et GRK6 qui permet le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, une molécule responsable de la désactivation de la signalisation des protéines G hétérotrimériques, et l'activation de ERK 1/2 [120, 125]. Subséquemment, la déphosphorylation de la  $\beta$ -arrestine provoque le recrutement des éléments responsables de l'endocytose du récepteur. [126]. Ce processus de relocalisation et de recyclage du récepteur CXCR4 induit par la  $\beta$ -arrestine est important pour la chimiotaxie. En effet, les lymphocytes issus de souris KO pour la  $\beta$ -arrestine possèdent un potentiel chimiotactique fortement diminué [127].



**Figure 1.9** Représentation schématique des voies de signalisation de CXCR4.

(Figure provenant de Murphy et al, 2000)

### **1.6.6 L'homodimérisation des récepteurs CXCR4**

Il est fréquent que les récepteurs de chimiokines forment des homodimères et des hétérodimères fonctionnels [124, 128]. Le récepteur CXCR4 ne fait pas exception, et possède la capacité de former des homodimères CXCR4-CXCR4. Toutefois, bien que de nombreuses études suggèrent que l'homodimérisation de CXCR4 se fait de façon constitutive [128-131]), cette conclusion demeure controversée. Par exemple, plusieurs indices suggèrent que la liaison du ligand SDF-1 serait nécessaire à l'homodimérisation de CXCR4 [132], une hypothèse qui est supportée par l'examen de la structure cristallographique du dimère CXCR4 [113].

### **1.6.7 CXCR4 dans la domiciliation vers la niche osseuse.**

Le phénomène de migration et de rétention dans la moelle est appelé domiciliation. Or, le processus de domiciliation des cellules requiert la chimiotaxie vers SDF-1 permise par CXCR4 [133-135]. En effet, la chimiokine SDF-1 est exprimée par les cellules de la moelle osseuse (ostéoblastes immatures, cellules stromales et endothéliales, cellules souches, etc.) afin de retenir et d'ancrer les cellules souches hématopoïétiques [136-138]. Ce processus est exploité notamment pour permettre la domiciliation des cellules provenant des greffes de moelle. La niche fournit ensuite les conditions structurales et environnementales propices pour la protection et la survie de ces cellules [139].

Des sous-populations des cellules leucémiques métastatiques peuvent, par le même principe, être dirigées et séquestrées dans la niche osseuse [140-142]. Ancrées dans la niche, elles bénéficient d'une protection provenant des cellules stromales qui les

protègent de l'apoptose induite par la chimiothérapie [142, 143]. Cet ancrage dans la niche diminue donc l'efficacité des traitements anticancéreux, dégrade le pronostic et augmente les chances de rechute [144, 145].

Les mécanismes impliqués dans la protection offerte par la niche sont complexes. Ils impliquent la participation de plusieurs cytokines, chimiokines et molécules d'adhésion [146]. Toutefois, la chimiokine SDF-1 et son récepteur, CXCR4, ont été isolés en tant que régulateurs critiques des interactions entre les cellules leucémiques et les cellules stromales [145, 147].

Ces observations ont mené au ciblage du récepteur CXCR4, longtemps considéré le seul récepteur pour le ligand SDF-1, par des antagonistes sélectifs. Et ce, dans le but de rendre les cellules leucémiques vulnérables aux traitements chimiothérapiques.

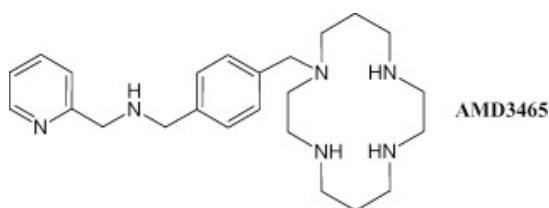
### **1.6.8 L'inhibition de CXCR4 par des molécules synthétiques**

Étant donné que les interactions des cellules tumorales avec l'environnement de la niche de la moelle osseuse provoquent des conditions qui rendent les cellules cancéreuses résistantes aux agents thérapeutiques et que les niveaux d'expressions élevés de CXCR4 ont été reliés à de mauvais pronostics [50], plusieurs groupes de recherche ont entrepris de tenter de bloquer ou d'inhiber le récepteur CXCR4 avec des molécules sélectives [57, 148].

Le premier composé artificiel à avoir donné des résultats satisfaisants dans le blocage sélectif de CXCR4 est l'AMD3100, un inhibiteur de CXCR4 [149] qui induit l'interruption des interactions des cellules hématopoïétiques ancrées dans la

niche envers les cellules stromales, et provoque leurs relâchements dans la circulation in vivo [148, 150]. Il a été démontré que cette mobilisation augmente significativement la sensibilité des cellules cancéreuses ciblées envers les traitements chimiothérapiques [57] et a pu augmenter les quantités de cellules cancéreuses apoptotiques in vivo. Malheureusement, cette technique n'est pas suffisamment sélective, et provoque la mobilisation de grandes quantités de cellules progénitrices saines provenant de la moelle [151], une situation qui n'est pas soutenable à long terme.

Plusieurs autres composés ont été utilisés par la suite, avec des résultats similaires. Ceci inclut, par exemple, les agonistes inverses de CXCR4 T140 et TC14012, qui ont pour effet d'occuper le site de liaison de SDF-1 sur le récepteur CXCR4 et de bloquer complètement la migration des cellules leucémiques vers SDF-1 [152]. Ceci inclut également les peptides dérivés de la protéine inflammatoire des macrophages 2 (par exemple : le RCP168) qui sont parvenus à augmenter la vulnérabilité des cellules cancéreuses traitées envers les agents thérapeutiques, et l'AMD3465, un inhibiteur de CXCR4 de seconde génération qui produit des effets similaires au AMD3100, mais à de plus faibles concentrations [153].



**Figure 1.10** Structure de l'AMD 3465, antagoniste synthétique de CXCR4 basé sur le N-pyridinylmethylene monocyclam.

### **1.6.9 CXCR4 comme marqueur de pronostic**

Jusqu'à la découverte récente de CXCR7, le SDF-1 était considéré comme l'unique ligand biologique de CXCR4, et CXCR4 était considéré le récepteur exclusif de SDF-1. Aussi, étant donné son rôle prédominant dans la chimiotaxie, l'adhésion cellulaire et l'angiogenèse dans le cancer, plusieurs équipes de recherche ont tenté d'utiliser l'expression du récepteur CXCR4 comme marqueur de pronostic [89].

C'est ainsi qu'une forte expression de CXCR4 a été reliée à l'agressivité métastatique, l'invasion tumorale et le mauvais pronostic de plusieurs types de cancer, tel que le cancer du sein, de l'estomac, des poumons, de la thyroïde, du cerveau, des os, du pharynx, du pancréas et de la peau. Toutefois, malgré le lien entre la surexpression de CXCR4 et le phénotype métastatique, la corrélation entre le niveau d'expression de CXCR4 et l'efficacité de migration reste controversée [154] et la seule valeur de l'expression de CXCR4 n'a jamais produit de corrélation suffisamment fiable pour que l'on s'en serve comme marqueur de prédisposition métastatique clinique [155-159]

Globalement, le niveau d'expression de CXCR4 reste donc une donnée insuffisante pour une utilisation pratique au niveau clinique et le récepteur reste une cible insuffisamment exploitée.

## **1.7 Le récepteur CXCR7**

La vision de l'exclusivité des relations entre CXCR4 et SDF-1 a pris fin avec l'identification d'un second récepteur sensible à la chimiokine SDF-1, le récepteur

CXCR7. Découvert dans le début des années 1990, ce récepteur couplé aux protéines G (RCPG) provient du clonage d'une librairie d'ADNc de la thyroïde de chien [160]. Anciennement nommé RDC1 (*Receptor Dog cDNA*) et longtemps considéré comme un récepteur orphelin, ce n'est qu'en 2005 que la chimiokine SDF-1 a été identifiée comme son ligand biologique [91, 161]. Le récepteur (renommé CXCR7) bouleverse le domaine d'étude de la chimiotaxie.

La raison pour cela est que l'interprétation des effets biologiques de SDF-1 nécessite désormais de prendre en considération les deux récepteurs de la chimiokine [67]. Ceci signifie que de nombreuses observations et de nombreuses conclusions obtenues par le passé concernant le rôle du couple CXCR4/SDF-1 doivent être réexaminées, étant donné la présence d'une cible alternative pour la chimiokine SDF-1 [38].

### **1.7.1 La Structure du récepteur CXCR7**

CXCR7 est un récepteur à sept domaines transmembranaires de la même famille que CXCR4. Tout comme CXCR4, son extrémité amino-terminale se trouve dans le milieu extracellulaire et sa queue C-terminale se trouve dans le milieu intracellulaire. Contrairement à CXCR4, CXCR7 ne possède pas de motif conservé DRYLAIV dans sa deuxième boucle extracellulaire. Ce motif est habituellement nécessaire pour le couplage avec les protéines G hétérotrimériques et leur activation subséquente chez la majorité des récepteurs de chimiokines. Il possède plutôt un motif DRYLIST, similaire à celui du récepteur CXCR6 [162]. Cela n'explique cependant pas l'absence de signalisation intracellulaire par les RCPG's, car le motif DRYLIST permet la signalisation classique dans CXCR6.

Chez l'humain, CXCR7 se retrouve sur le chromosome 2, au même endroit que les gènes qui encodent les récepteurs CXCR1, CXCR2 et CXCR4. L'homologue du CXCR7 humain chez la souris se trouve sur le premier chromosome, également près des gènes encodant CXCR2 et CXCR4. Aussi, le CXCR7 de souris possède une similarité de séquence de 91 % avec le CXCR7 humain.

En plus de SDF-1/CXCL12 et contrairement à CXCR4, CXCR7 possède la capacité de lier I-TAC/CXCL11. Toutefois, cette liaison se fait avec une affinité dix fois moindre [160]. L'internalisation de CXCR7 a été démontrée, mais le processus semble fonctionner sans la participation des protéines G [163].

### **1.7.2 L'expression du récepteur CXCR7**

CXCR7 est exprimé dans plusieurs types de cellules hématopoïétiques, telles que les monocytes, les lymphocytes B, les lymphocytes T, les neutrophiles et leurs précurseurs respectifs [164, 165]. Le CXCR7 est aussi présent dans de nombreux tissus tels que le cœur, les os, le cerveau, les reins, les poumons, les ovaires, dans les cellules endothéliales du système vasculaire et dans les neurones du système nerveux central. [164-168]). Dans la souris, CXCR7 est particulièrement exprimé dans les lymphocytes B et dans les cellules marginales de la rate [164]. Le niveau d'expression de CXCR7 peut varier de façon importante entre différentes cellules. Dans plusieurs cellules progénitrices, le niveau d'expression de CXCR7 corrèle avec le stade de différenciation [165].

### **1.7.3 L'expression de CXCR7 dans le cancer**

Il a été observé qu'une grande variété de cellules cancéreuses surexpriment le récepteur CXCR7 [161]. Les cellules du cancer du sein et du cancer du poumon qui possèdent un potentiel métastatique élevé ont également une expression élevée de CXCR7 [169]. La surexpression de CXCR7 peut également être corrélée avec le potentiel prolifératif des cellules cancéreuses, ainsi qu'avec leurs capacités à la vascularisation et avec la fréquence des métastases [170]. L'expression de CXCR7 est très élevée à la surface de cellules tumorales cervicales, du colon et les sarcomes [38]. Le CXCR7 est également surexprimé dans le cas des métastases agressives, et dans les tumeurs dont la croissance est jugée rapide [171, 172]. De plus, l'expression de CXCR7 semble être particulièrement élevée dans les pathologies auto-immunes, incluant la sclérose en plaque, les rhumatismes et l'arthrite [173], [174]. Aussi, les cellules endothéliales formant les vaisseaux sanguins associés aux tumeurs expriment CXCR7, ce qui n'est pas le cas des cellules endothéliales normales [161].

### **1.7.4 La signalisation atypique du récepteur CXCR7**

Il a été observé que bien que CXCR7 fasse partie de la famille des récepteurs de chimiokine, il ne signale pas de la façon classique qui est généralement associée à la chimiotaxie. En effet, les récepteurs de chimiokines couplés aux protéines G signalisent habituellement exclusivement par les protéines G hétérotrimériques, plus particulièrement par les protéines de la famille Gi (lesquelles provoquent l'inhibition de l'adénylate cyclase) et sont subséquemment désensibilisés par



l'association avec la  $\beta$ -arrestine, laquelle bloque les activations subséquentes des protéines G. Or, le récepteur CXCR7 ne suit pas ce modèle. La liaison du ligand SDF1 au récepteur CXCR7 ne produit pas l'activation des protéines G, ne provoque pas l'inhibition de l'adénylate cyclase, ne provoque pas la mobilisation du calcium intracellulaire et ne provoque pas la migration cellulaire [161, 166, 175, 176]. Le CXCR7 interagit physiquement et constitutivement avec la protéine Gai, mais ne l'active pas [166].

Cette incapacité à relayer le signal intracellulaire par les voies habituellement associées aux RCPG's a contribué catégoriser le récepteur CXCR7 en tant que récepteur silencieux (ou « decoy ») [177], mais cette hypothèse a depuis été réfutée par de nombreuses études qui ont démontré que le récepteur CXCR7 possède une certaine forme de signalisation [175, 177-181], ainsi qu'un rôle important dans la chimiotaxie [105, 161, 164, 166, 181-183]

### **1.7.5 Le recrutement de la $\beta$ -arrestine par le récepteur CXCR7**

Un indice sur la méthode de régulation exercée par CXCR7 a été découvert en 2009, lorsque qu'il a été démontré que la liaison d'un agoniste de CXCR7 (incluant SDF-1) provoque le recrutement de la  $\beta$ -arrestine au récepteur [184]. La  $\beta$ -arrestine est habituellement mise en cause dans l'interruption du signal des protéines G, et l'activation de la  $\beta$ -arrestine par les « G-protein-coupled receptor kinases » (GRKs) produit habituellement des interactions avec les clathrines qui provoquent l'endocytose des récepteurs, ce qui facilite leur retrait de la surface cellulaire, un mécanisme qui a été confirmé dans le cas de CXCR7 [185]. Toutefois, il est aussi

possible que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine provoque des cascades signalétiques, par exemple via l'activation de MapKinases tel que les MAPK 42/44 [186]. Cette hypothèse est confirmée par l'observation que le recrutement de la  $\beta$ -arrestine 2 par CXCR7 provoque non seulement l'internalisation du récepteur, mais aussi la phosphorylation des MAPK ERK, et ce, de façon indépendante des protéines G [179, 187, 188].

### **1.7.6 L'hétérodimérisation du récepteur CXCR7 avec CXCR4**

Les récepteurs de chimiokines sont reconnus pour leur capacité à dimériser et oligomériser d'une façon qui régule la fonction de la chimiotaxie [189-191]. En 2009, il a été observé que la coexpression de CXCR7 avec CXCR4 module la signalisation par les protéines G via la création d'hétérodimères CXCR7-CXCR4. Ces hétérodimères sont capables de changements conformationnels, mais l'association de CXCR7 avec CXCR4 inhibe l'activation des protéines  $G_i$  et bloque la signalisation habituellement associée avec CXCR4 [166]. Il est donc possible que l'expression de CXCR7 module directement les fonctions de CXCR4. Ces observations sont supportées par les travaux de Décaillot et al, qui démontrent que la co-expression de CXCR7 avec CXCR4 provoque des hétérodimères qui recrutent constitutivement la  $\beta$ -arrestine [181]. De plus, bien que l'activation des protéines  $G_i$  soit fortement inhibée dans les complexes CXCR4-CXCR7, la chimiotaxie vers SDF-1 se retrouve paradoxalement augmentée. Ceci s'explique potentiellement par les voies de signalisation de ERK1/2, p38 MAPK et de la SAPK, qui sont toutes augmentées par l'hétérodimérisation de CXCR4 et CXCR7 et abrogées par la déplétion de la  $\beta$ -arrestine par des RNAi ou par l'élimination de CXCR7 [181].

### **1.7.7 Le recyclage de CXCR7 et la régulation du SDF-1**

Il est possible que l'une des fonctions régulatrices de CXCR7 soit l'internalisation et la dégradation de la chimiokine SDF-1. En effet, il a été démontré que la liaison du SDF-1 à CXCR7 provoque l'internalisation du couple et la relocalisation de SDF-1 vers les lysosomes (ou la chimiokine est ensuite dégradée) [91, 163, 192]. Ce processus est abrogé et l'internalisation de SDF-1 est diminuée dans les cellules qui sont traitées par des inhibiteurs de clathrines ou qui ne possèdent pas de  $\beta$ -arrestine, la molécule de signalisation de CXCR7 [185]. Ces observations ont été confirmées par plusieurs projets de recherches, qui ont démontré que le récepteur CXCR7 pouvait provoquer l'internalisation et la dégradation rapide d'une quantité significative de chimiokines [163, 185]. Le récepteur CXCR7 est subséquemment recyclé et retourné vers la surface cellulaire, d'une façon suffisamment rapide pour maintenir les niveaux de CXCR7 membranaire stables. La vitesse et la saturation de ce processus de dégradation de SDF-1 sont directement proportionnelles aux quantités exprimées de récepteurs CXCR7, ce qui suggère que l'un des rôles de CXCR7 pourrait être la régulation des quantités de SDF-1 en circulation libre dans le milieu extracellulaire [185].

### **1.7.8 L'implication de l'expression du récepteur CXCR7 pour les fonctions du CXCR4**

Plusieurs des indices accumulés jusqu'ici sur le rôle de CXCR7 suggèrent que l'expression de CXCR7 puisse exercer une modulation sur la voie de CXCR4–SDF-1. En effet, le CXCR7 interagit constitutivement avec la protéine *Gai* (la cible signalétique de CXCR4), et il est possible que l'expression de CXCR7 régule la disponibilité de la *Gai* pour CXCR4. Le CXCR7 surexprimé forme également des hétérodimères avec CXCR4 *in-vivo* d'une façon qui affecte fortement la signalisation de CXCR4 en réponse à SDF-1. Bien que l'existence de ces dimères *in vivo* ne soit pas encore démontrée, il est concevable que l'expression de CXCR7 module l'activation et la signalisation de CXCR4-SDF-1 par un processus d'hétérodimérisation. Le niveau d'expression de CXCR7 contrôle également la vitesse de la dégradation du SDF-1 disponible dans l'espace extracellulaire, le ligand naturel de CXCR4. L'activation de CXCR7 provoque également le recrutement de la  $\beta$ -arrestine, un élément reconnu pour abroger la signalisation par les protéines G. Ce processus se produit de façon constitutive lorsque le CXCR7 dimérise avec CXCR4, et provoque l'internalisation des deux récepteurs. Il est donc possible que CXCR7 contrôle l'activation et l'internalisation de CXCR4 via le recrutement de la  $\beta$ -arrestine. La présence de CXCR7 a également été mise en lien avec le contrôle des niveaux d'expression du récepteur CXCR4 [193]. De plus, il a été suggéré que l'abrogation de CXCR7 provoquait une augmentation significative des niveaux extracellulaires de SDF-1, un processus qui provoque éventuellement l'endocytose et l'internalisation de CXCR4 [193]. Ensembles, ces observations

suggèrent que le CXCR7 pourrait contrôler la voie de signalisation entre CXCR4 et SDF-1.

### **1.7.9 Polémique concernant l'inhibition de CXCR7**

Étant donné la tendance à surexprimer CXCR7 que possèdent les tumeurs hautement agressives, invasives et métastatiques (voir la section 1.4.4.3 : L'expression de CXCR7 dans le cancer), le récepteur CXCR7 a rapidement été classé en tant que facteur pro-tumoral (d'une façon similaire à CXCR4), et de nombreux ligands synthétiques ciblant spécifiquement CXCR7 ont été développés à des fins thérapeutiques. Ces ligands synthétiques spécifiques à CXCR7, dont le CCX451, le CCX754 et le CCX771, ont été créés de façon à agir d'une façon antagoniste en se liant avec une haute affinité au récepteur CXCR7 et empêchent ainsi le SDF-1 de s'y attacher. Dans le modèle murin, le traitement par CCX754 a été corrélé avec des tumeurs significativement plus petites [161]. Ces observations sont supportées in vitro, alors que le CCX754 ralentit la croissance des tumeurs. Une seconde étude a également démontré que le CCX754 inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose des cellules T immortalisées du virus T-lymphotropique humain lors de leurs interactions avec le récepteur CXCR7 [174]. Dans les astrocytes, le blocage de CXCR7 par CCX754 abolit la signalisation dépendante de SDF-1 [175].

Toutefois, il a été démontré (par la suite) que les ligands de CXCR7 agissent en tant qu'agonistes sur la voie de la  $\beta$ -arrestine. En effet, il a été démontré que la liaison d'au moins un ligand synthétique de CXCR7, le CCX771, induit directement le

recrutement de la  $\beta$ -arrestine à CXCR7, de la même façon que le ferait le ligand naturel du récepteur. De plus, cette molécule active la signalisation de CXCR7 avec un EC50 de 2,8 nM, (comparativement à 52 nM pour SDF-1) [187]. Cette observation fait donc de CCX771 un agoniste. Et, de plus, cet agoniste de CXCR7 inhibe la migration transendothéliale des cellules empruntant l'axe SDF-1/CXCR4 d'une façon plus efficace que l'antagoniste du récepteur CXCR4, l'AMD3100 [188], pourtant un inhibiteur puissant utilisé commercialement pour causer le relâchement des cellules hématopoïétiques ancrées dans la moelle.

#### **1.7.10 Polémique concernant le rôle de CXCR7 dans la migration vers SDF-1**

L'implication de CXCR7 dans la migration dirigée des cellules reste controversée. Les résultats de plusieurs équipes de recherches démontrent que CXCR7 n'induit pas la chimiotaxie [161, 176, 187] . Mais les observations amassées par de nombreux autres projets de recherche suggèrent paradoxalement que CXCR7 joue un rôle important dans le contrôle de la migration dirigée vers SDF-1 [91, 178, 181, 193, 194].

De plus, la classification de CXCR7 en tant que facteur pro-métastatique provient en grande part de la surexpression observée de ce récepteur dans les cellules cancéreuses hautement métastatiques [170, 195, 196]. Toutefois, le fait que CXCR7 soit hautement exprimé dans les cellules tumorales agressives et métastatiques ne signifie pas que CXCR7 soit responsable de ce comportement. Ces mêmes cellules tumorales surexpriment habituellement CXCR4, et le fait qu'un agoniste de

CXCR7 provoque les mêmes réactions physiologiques qu'un antagoniste de CXCR4 suggère que CXCR7 possède une fonction modulatrice contraire à celle de CXCR4, ce qui a été révélé par des observations *in vivo* [197].

Le rôle de CXCR7 dans la chimiotaxie vers SDF-1 n'a donc pas encore été clairement établi et la conséquence du niveau d'expression de CXCR7 sur le potentiel de migration des cellules reste mal exploré.

Le fait que le récepteur CXCR7 interagisse avec de nombreux éléments de la voie de signalisation de CXCR4/SDF-1 (voir section 1.4.3.8 : Implication de l'expression de CXCR7 pour les fonctions de CXCR4) suggère toutefois que l'expression de CXCR7 est un élément important dans la régulation de l'axe CXCR4/SDF1, ce qui en fait un sujet d'étude très prometteur.

## **1.8 Problématique**

La chimiokine CXCL12/SDF-1 est fermement établie comme étant responsable de la chimiotaxie et de la migration transendothéliale des cellules hématopoïétiques. Son implication dans plusieurs mécanismes clef du cancer, tel que dans la dissémination des métastases et dans la migration des cellules cancéreuses vers la niche hématopoïétique, (un phénomène qui a pour conséquence de protéger les cellules tumorales de la chimiothérapie) [40, 108, 109, 198] fait de l'étude des deux récepteurs de SDF-1 une priorité.

La découverte du récepteur CXCR7 comme cible alternative de SDF-1 incite à réviser les conclusions tirées sur le couple CXCR4-SDF-1 et ouvre la porte à une compréhension accrue du contrôle de la chimiotaxie.

Toutefois, cette étude est complexifiée par le fait que le récepteur CXCR7 est un récepteur atypique qui ne signale pas par la voie classique des RCPG's. Elle est également complexifiée par la découverte que des agonistes inverses de CXCR4 tels que le TC14012 et des antagonistes tels que l'AMD3100 produisent un effet agoniste sur la voie des  $\beta$ -arrestine de CXCR7 [188]. Il est donc nécessaire de revoir le rôle de CXCR7 dans la chimiotaxie et d'étudier les conséquences de sa surexpression sur la migration dirigée par le couple SDF-1/CXCR4.

## **1.9 Projet de Recherche**

Dans ce projet de recherche, nous étudions la possibilité que la mesure du niveau d'expression quantitatif de CXCR4 et de CXCR7 permette d'obtenir des informations pertinentes sur le comportement physiologique des cellules leucémiques, et plus particulièrement sur l'efficacité de leurs chimiotaxie vers un gradient de SDF-1

Le premier objectif de ce projet est donc de mesurer l'expression de CXCR4 et CXCR7 au niveau de l'ARNm dans plusieurs lignées de cellules leucémiques différentes de façon à vérifier l'existence d'un lien entre le niveau d'expression des récepteurs de SDF-1 et le potentiel de migration chimiotactique des cellules vers SDF-1.



Le second objectif de ce projet est de mesurer l'expression de CXCR4 et de CXCR7 au niveau de la protéine dans plusieurs lignées leucémiques de façon à vérifier l'existence d'un lien entre les quantités de récepteurs présents dans les cellules et leurs potentiels de migration chimiotactique vers SDF-1.

Un objectif secondaire de ce projet est d'examiner la possibilité que la mesure du niveau d'expression relatif des deux récepteurs (l'un par rapport à l'autre) puisse produire des informations pertinentes sur le potentiel de chimiotaxie des cellules leucémiques.

Ce projet de recherche contribuera à déterminer le rôle de CXCR7 et les conséquences de son expression dans la régulation de la chimiotaxie des cellules leucémiques.

## 2. MATÉRIEL ET MÉTHODES

## 2.0 MATERIEL ET METHODES

### Modèle expérimental

Les membranes microporeuses servent de modèle efficace pour mesurer l'ampleur de la migration chimiotactique des leucocytes. Dans ce modèle, un puits de migration est séparé horizontalement en deux compartiments par une membrane microporeuse. Les cellules placées dans la chambre supérieure migrent au travers des pores de la membrane vers la chimiokine SDF-1 contenue dans la chambre inférieure. Après une période d'incubation de 3 heures, la membrane supérieure est retirée et le nombre de cellules qui ont migré vers le compartiment inférieur est mesuré.

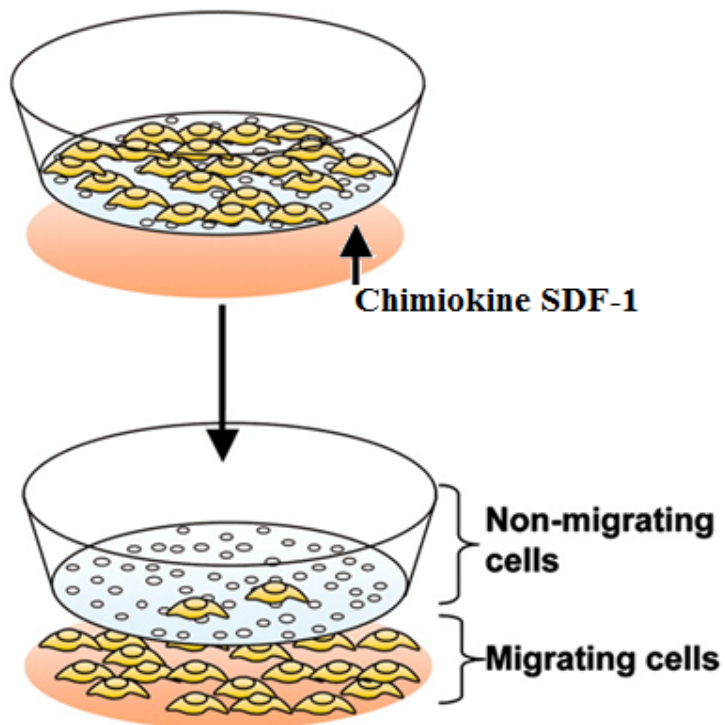
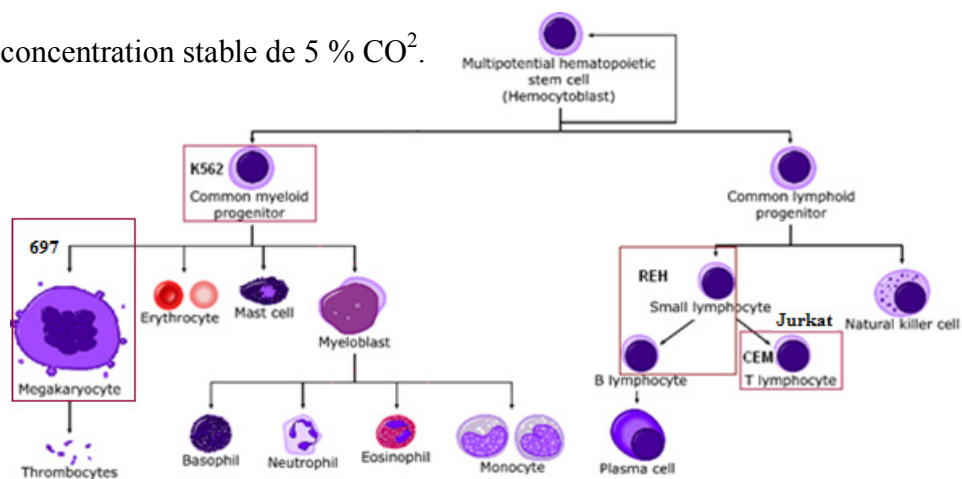


Figure éditée à partir de Inoue et al, 2007

**Figure 2.1.** Illustration du modèle expérimental choisit pour mesurer le potentiel de chimiotaxie vers la chimiokine SDF-1 des cellules leucémiques. *(Figure provenant de Inoue et al 2007)*

## Lignées cellulaires et conditions de culture

Les lignées cellulaires leucémiques humaines REH, K562, CEM et HEK ont été utilisés dans ce projet de recherche. La lignée cellulaire REH est composée de cellules lymphoïdes progénitrices qui sont bloquées à un stade de différenciation en aval des lymphocytes B (*DSMZ N°ACC22*). La lignée cellulaire K562 est composée de cellules myéloïdes progénitrices qui peuvent se différencier en granulocytes ou en érythrocytes (*DSMZ N°ACC10*). La lignée cellulaire CEM et la lignée cellulaire Jurkat sont composées de cellules lymphoblastes T (*DSMZ N°ACC240 et DSMZ N°ACC282*). La lignée cellulaire 697 est composée de cellules megacaryoblastes (*DSMZ N°ACC697*). La lignée cellulaire Jurkat est composée de cellules megacaryoblastes (*DSMZ N°ACC697*). La lignée cellulaire HEK est composée de cellules embryonique de rein (*DSMZ N°ACC305*). Les cellules REH, K562 et CEM ont été maintenues dans du RPMI1640, supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin et 1 % Streptomycin/Pénicilline. Les cellules HEK ont été maintenues dans du DMEM supplémenté avec 10% de sérum fœtal bovin et 1% Streptomycin/Pénicilline. Tous les milieux de cultures ont été maintenus à 37 °C à une concentration stable de 5 % CO<sup>2</sup>.



**Figure 2.2. Illustration du stade de différenciation des différentes lignées cellulaires leucémiques analysées dans le projet de recherche.** (Figure provenant de *Regenerative medicine*, 2006)

## **Détection et mesure de l'expression des récepteurs de chimiokines par cytométrie en flux**

La quantité de récepteurs situés à la surface membranaire et à l'intérieur des cellules a été mesurée par cytométrie en flux.  $5 \times 10^6$  cellules ont été incubées avec l'anticorps approprié durant 30 minutes à 4 °C dans le PBS avec 0.5 % BSA. Elles ont ensuite été lavées dans le même tampon. Après lavages, les cellules ont été resuspendues et fixées dans du paraformaldéhyde 0.5 % , incubées à 4 °C pour 10 minutes, et analysées en utilisant un appareil FACScalibur par l'examen de la fluorescence de  $1 \times 10^4$  cellules par échantillon. Les anticorps monoclonaux de souris antihumains suivants, provenant tous de R&D Systems (Abingdon, United Kingdom), ont été utilisés pour le marquage des récepteurs : IgG2A (APC)-conjugué anti-CXCR4 (clone 12G5), IgG2A (PE)-conjugué anti-CXCR4 (clone 12G5), IgG2A (APC)-conjugué anti-CXCR7/RDC-1 (clone 358426), IgG2A (PE)-conjugué anti-CXCR7/RDC-1 (clone 358426) et IgG2A (APC)-conjugué anti-CXCR7/RDC-1 (clone 11G8).

## **Cytométrie en flux quantitative (CMFQ)**

### **La méthode de quantification en immunofluorescence directe Quantibrite® (BD Biosciences)**

La méthode Quantibrite® de Becton Dickinson a été utilisée pour obtenir une mesure quantitative absolue qui convertit une mesure relative de la fluorescence en nombre de sites antigéniques par cellule. Pour ce faire, la fluorescence relative moyenne (MFI) des récepteurs à quantifier est convertie en unités stœchiométriques

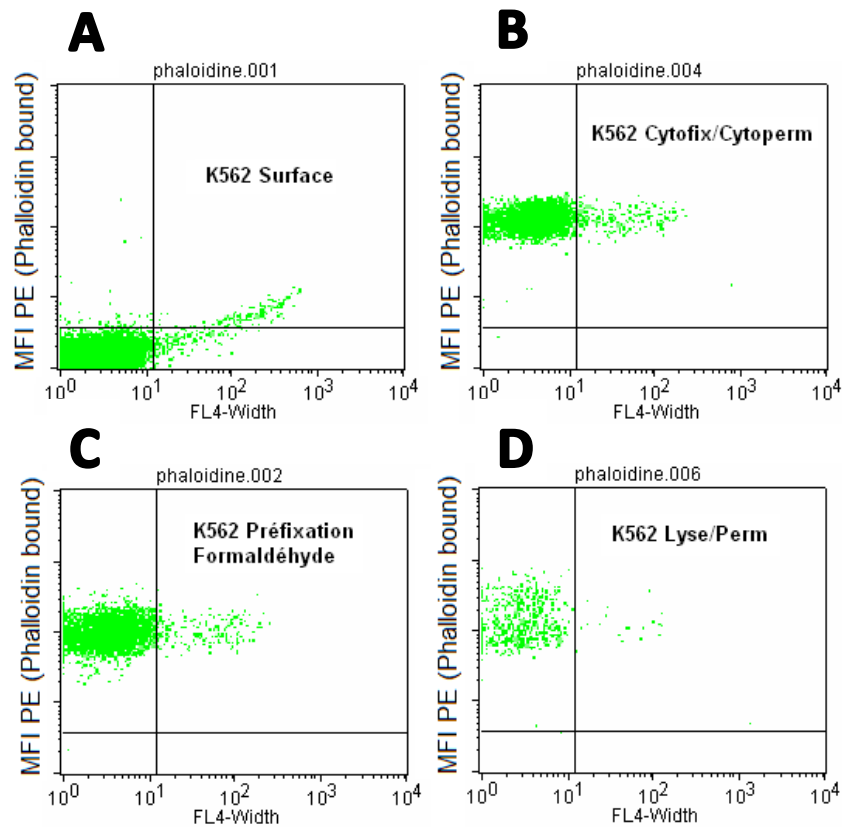
de molécules de fluorochrome en solution (unités MESF) et ensuite rapportée par référence à une courbe standard de billes couplées à des quantités connues et croissantes de phycoérythrine 11. Cette méthode donne directement des résultats en nombre de molécules d'anticorps fixées à la surface de la cellule. Un tube de billes lyophilisées "*BD Quantibrite™ PE Beads*" a été suspendue dans 0.5ml de tampon PBS +0.5 % BSA et passé au cytomètre de flux pour chaque expérience. 10 000 évènements ont été comptés par le cytomètre, les cellules viables ont été sélectionnées sur les axes FSC (volume) et SSC (forme) du cytomètre et l'axe FL2 a été convertie en molécules PE liés par cellules grâce aux quantités connues de phycoérythrine sur les billes. Dans cette étape, nous assumons que les anticorps utilisés sont couplés à une seule molécule de phycoérythrine (dit 1/1).

Cette méthode est limitée par l'exclusivité de la quantification en PE (les billes de quantifications ne sont pas disponibles en APC). Cette méthode a été utilisée avant chaque journée d'expérimentation. Elle n'a pas été utilisée dans les expériences qui impliquent d'autres éléments qui émettent de la fluorescence dans l'axe FL-2 (par exemple, le tag rapporteur –YFP des plasmides de transfections), ce qui explique que les mesures dans les K562 soient largement présentés en MFI plutôt qu'en nombre de récepteurs.

## Perméabilisation cellulaire

Le kit BD Cytotfix/Cytoperm™ a été utilisé pour la fixation et la perméabilisation simultanée des cellules préalablement au marquage des récepteurs intracellulaires. Les cellules ont été resuspendues dans 250 uL de la solution BD Cytotfix/Cytoperm™ et incubées à 4 °C durant 20 minutes. Les cellules ont ensuite été lavées à deux reprises dans la solution BD Perm/Wash™, une solution tampon utilisant la saponine pour maintenir la perméabilisation cellulaire, et marquées par des anticorps fluorescents.

L'efficacité de la perméabilisation a été examinée par l'utilisation d'un marqueur fluorescent lié à la phalloïdine, une toxine qui se lie spécifiquement aux filaments du cytosquelette (et qui ne peut pas pénétrer la cellule sans perméabilisation cellulaire préalable). On observe que la méthode BD Cytotfix/Cytoperm™ est efficace pour perméabiliser les cellules dans le cadre d'un marquage intracellulaire (**Figure 3.2.1**), c'est donc cette méthode qui a été choisie pour les expériences suivantes de notre étude. On observe également qu'une préfixation avec le formaldéhyde (même à une faible dose de 0.1 %) permet la perméabilisation des cellules. Ceci explique que la préfixation ne soit pas utilisée dans les marquages de ce projet de recherche.



**Figure 2.3 Détection de la phalloïdine dans le milieu intracellulaire des cellules K562 en fonction de la technique de perméabilisation utilisée.** **A.** Mesure par cytométrie en flux de l'intensité de la fluorescence moyenne (MFI) dans les bandes FL2 (correspond au fluorochrome PE) de  $5 \times 10^6$  cellules K562 sans perméabilisation. Les cellules ont été incubées durant 30 minutes avec un marqueur phalloïdine couplé à un fluorochrome PE avant d'être lavées et examinées par FACScalibur. **B.** Mesure la MFI de  $5 \times 10^6$  cellules K562 suite à la perméabilisation par le protocole Cytofix/Cytoperm™. Suite à la perméabilisation, les cellules ont été incubées 30 minutes avec de la phalloïdine couplée à un fluorochrome PE avant d'être lavées et examinées par FACScalibur. **C.** Mesure la MFI dans les bandes PE et APC (FL4 width) de  $5 \times 10^6$  cellules K562 suite à une préfixation avec une solution de formaldéhyde 0.1 %. Suite à la préfixation, les cellules ont été incubées 30 minutes avec de la phalloïdine couplée à un fluorochrome PE avant d'être lavées et examinées par FACScalibur. **D.** Mesure la MFI dans les bandes PE et APC (FL4 width) de  $5 \times 10^6$  cellules K562 suite à une perméabilisation puissante avec la solution de Lyse/Perm de BD. Suite à la perméabilisation, les cellules ont été incubées 30 minutes avec de la phalloïdine couplée à un fluorochrome PE avant d'être lavées et examinées par FACScalibur. (N=1)



## **Transfection cellulaire**

Les cellules K562 ont été transfectées par le Nucleofector® Kit V d'Amara en utilisant le programme T-003 du nucléofecteur 2b de Lonza en accord avec les spécifications du fabricant. Cette méthode de transfection a été sélectionnée à la suite d'essais d'optimisation parce qu'elle offrait à la fois le meilleur taux de transfection et la proportion de survie des cellules la plus élevée.

## **Mesure de la chimiotaxie**

Les essais de migration ont été effectués sur des plaques de migration de 96 puits en utilisant des membranes de polycarbonates Neuroprobe® munies de pores de 5 µm. La chimiokine SDF1/CXCL12 utilisée provient de Peprotech Inc (Rocky Hill, NJ). Le SDF-1/CXCL12 a été dilué à des concentrations variées dans un tampon de migration composé de RPMI1640 contenant 0.2 % BSA. 29 µl de tampon de migration contenant la chimiokine ont été déposés dans chacun des compartiments inférieurs d'une plaque d'essais migratoire Chemicon QCM™ 5 µm 96-well migration assay plate (Millipore, Billerica, MA). Les cellules ont été affamées durant 1 heure dans un milieu RPMI1640 0.2 % BSA à 37°C avant la migration. Les cellules ont été resuspendues dans 25 µl de RPMI1640 0.2 % BSA et déposées dans le compartiment supérieur de chaque puits de migration. Les cellules ont ensuite pu migrer à une température de 37 °C et à une concentration de CO<sup>2</sup> contrôlée de 5 % durant une période de 3 heures. La migration a été interrompue par le retrait de la chambre supérieure et l'aspiration des cellules non-migrées. L'activité migratoire a ensuite été mesurée par le comptage des cellules présentes dans la chambre inférieure et a été rapportée en tant qu'index de chimiotaxie en

divisant le pourcentage de cellules ayant migré vers le compartiment inférieur dans les contrôles. Étant donné les petits volumes impliqués et la quantité de puits de migration, un compteur cellulaire automatique TC10 de Biorad a été utilisé pour les essais les plus volumineux par souci de précision.

### **Extraction d'ARN et RT-PCR**

L'ARN total présent dans les cellules hématopoïétiques a été extrait à l'aide du kit Trizol de Invitrogen. La technique de RT-PCR a ensuite été utilisée avec la polymérase GoTaq et la Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase de Invitrogen. Lors de la procédure, 1 Microgram d'ARN total a été transcrit inversément en ADNc, suivi d'une amplification en utilisant des amorces spécifiques pour le CXCR4 humain (5' CTCCAAGCTGTCACACTCCA 3' et 5' TCGATGCTGATCCCAATGTA 3'), et pour le CXCR7 humain (5' GCACTACATCCCGTTCACCT 3' et 5'AAGGCCTTCATCAGCTCGTA 3').

### **Analyse statistique**

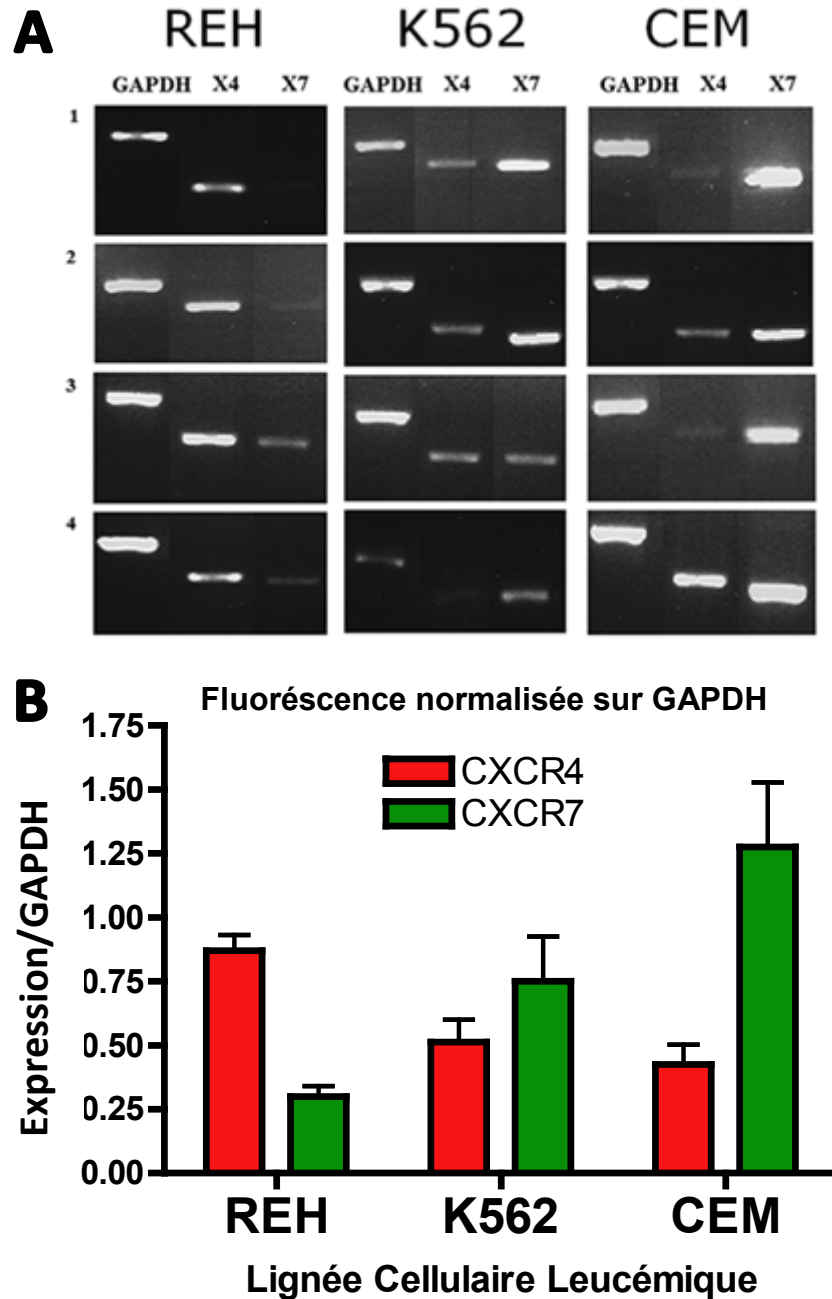
Les données de ce projet sont généralement rapportées en tant que moyenne  $\pm$  SEM. Des méthodes de régression linéaire ont été utilisées pour analyser les graphiques. Des tests statistiques tels que le test de Pearson, le test T de Student et l'ANOVA à une voie ont été utilisés dans l'analyse des données. Le coefficient de corrélation de Pearson et son test associé permettent de mesurer et tester si deux variables continues distinctes  $(X_{quant})_1$ ,  $(X_{quant})_2$  sont corrélées et la nature de cette corrélation. Toutes les statistiques ont été calculées en utilisant le logiciel Graphpad Prism version 4.00 pour Windows (GraphPad Software, San Diego California USA).

### 3. RÉSULTATS

### **3.1: Les récepteurs CXCR4 et CXCR7 sont exprimés à des niveaux différents dans différentes cellules leucémiques**

L'expression de CXCR4 et CXCR7 a été mesurée au niveau de l'ARN messenger par RT-PCR dans plusieurs lignées leucémiques. Ces mesures sont non-quantitatives, car la luminosité des bandes obtenues avec l'ADN amplifié dépend du temps d'exposition (et de la méthode d'analyse). Les résultats sont donc obtenus en multiples de la luminosité du GAPDH, un gène rapporteur. De plus, le nombre de cycles utilisés pour l'amplification n'est pas le même pour les amorces de CXCR4 (23) et de CXCR7 (27). Cette technique nous permet donc uniquement de comparer l'expression des différentes lignées cellulaires entre-elles.

Comme on peut l'observer sur la **Figure 3.1**, le patron d'expression au niveau de l'ARN messenger diffère entre les lignées cellulaires. Les cellules REH, des petits lymphocytes pre-B, expriment plus fortement CXCR4 que les deux autres lignées, mais relativement peu de CXCR7. En comparaison, les CEM, des lymphocytes T, expriment moins de CXCR4 que les REH, mais beaucoup plus de CXCR7. Les cellules K562, des cellules progénitrices myéloïdes, semblent avoir un patron d'expression intermédiaire en comparaison aux deux autres lignées.



**Figure 3.1. Expression relative de CXCR7 et de CXCR4 au niveau de l'ARN messager dans les cellules leucémiques.** A. Détection de l'expression de l'ARNm GAPDH, CXCR4 (X4) et CXCR7 (X7) sur gel d'agarose 1 % w/v marqué au bromure d'éthidium après amplification par PCR conventionnelle de 1 µg d'ADN total en utilisant la polymérase GoTaq et la Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase de Invitrogen pour 23 cycles (GAPDH et CXCR4) et 27 cycles (CXCR7) (N=4). B. Intensité (Moyenne±ESM) de la fluorescence relative de l'ARNm CXCR4 et CXCR7 exprimé chez les lignées leucémiques après amplification par PCR et normalisation sur le gène rapporteur GAPDH (N=4).

### **3.2 : Le récepteur CXCR4 est présent à la fois à la surface cellulaire et dans les compartiments intracellulaires, alors que le récepteur CXCR7 est presque entièrement localisé dans des compartiments intracellulaires**

La caractérisation de l'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 a été complétée au niveau protéique en examinant la surface cellulaire et le milieu intracellulaire des cellules étudiées par perméabilisation, marquage avec des anticorps couplés à des fluorochromes et par cytométrie de flux. Plusieurs lignées différentes ont été analysées dans le but d'obtenir des informations sur plusieurs types cellulaires. Les REH sont des lymphocytes pre-B, les K562 sont des cellules myéloïdes, les CEM et les Jurkat sont des lymphocytes T et les 697 sont des megacaryoblastes.

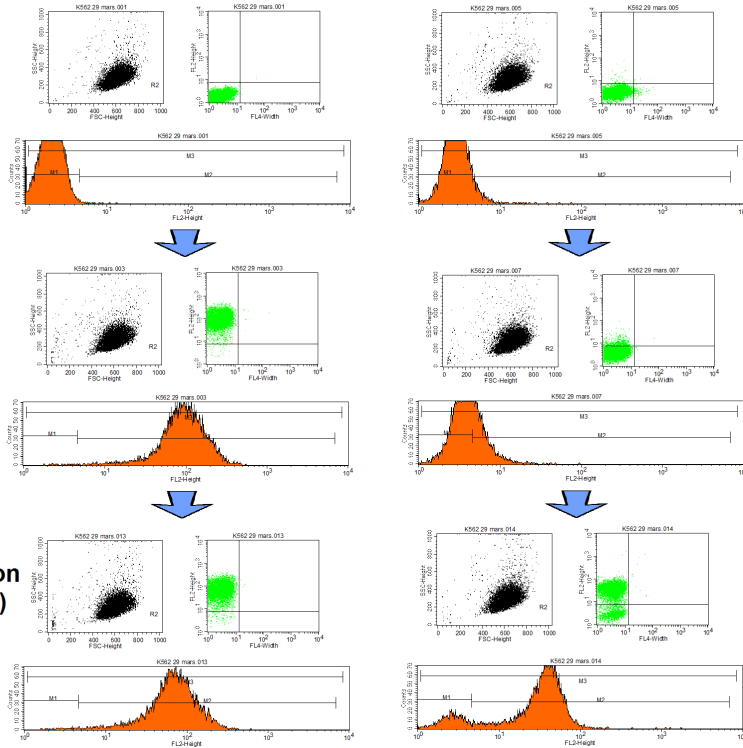
Dans les cellules K562, le récepteur CXCR4 se retrouve en quantités appréciables à la surface cellulaire (**Figure 3.2.2**). Le récepteur CXCR7, par contre, ne se retrouve pas à la surface cellulaire. En effet, le récepteur CXCR7 n'est détectable en quantité significative qu'après perméabilisation et semble être localisé en grande majorité à l'intérieur des cellules. La même observation a été faite dans les cellules REH et les cellules CEM, ainsi que dans d'autres lignées leucémiques qui ont été étudiées pour renforcer l'hypothèse que CXCR7 ne se trouve pas à la surface cellulaire dans les leukocytes (**Figure 3.2.2 B et C**). Ceci reste vrai avec l'utilisation de techniques alternatives de perméabilisation (incluant la lyse cellulaire), et ce, dans toutes les lignées leucémiques examinées.

# A

Contrôle

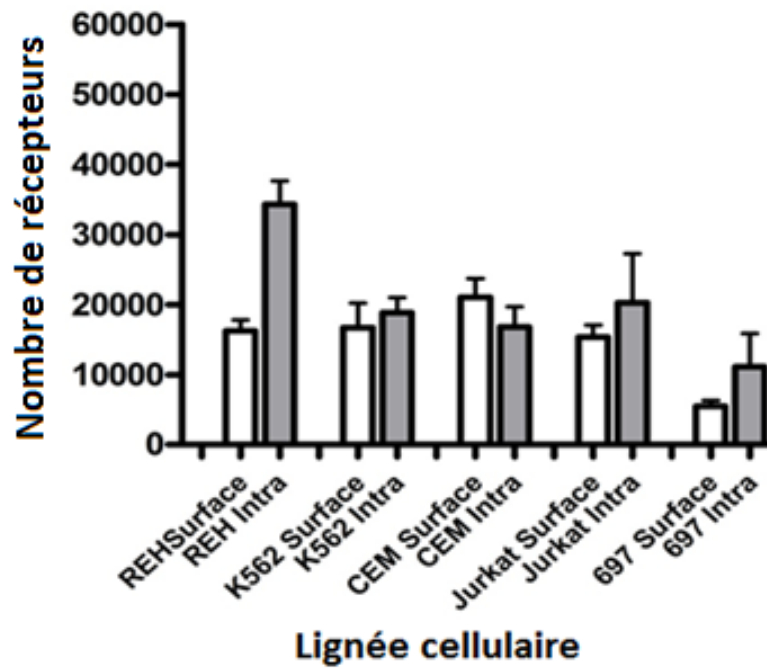
CXCR4

CXCR7

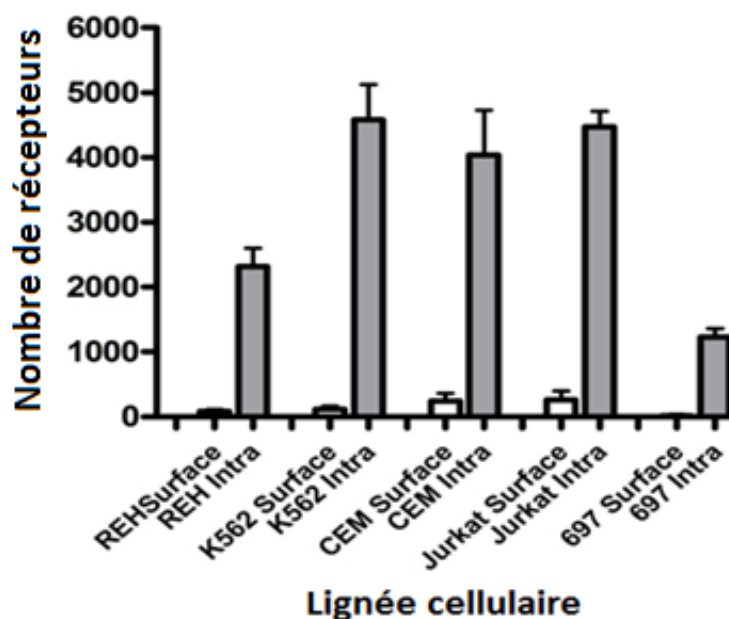


# B

CXCR4 dans différents types de cellules leucémiques



## C CXCR7 dans différents types de cellules leucémiques

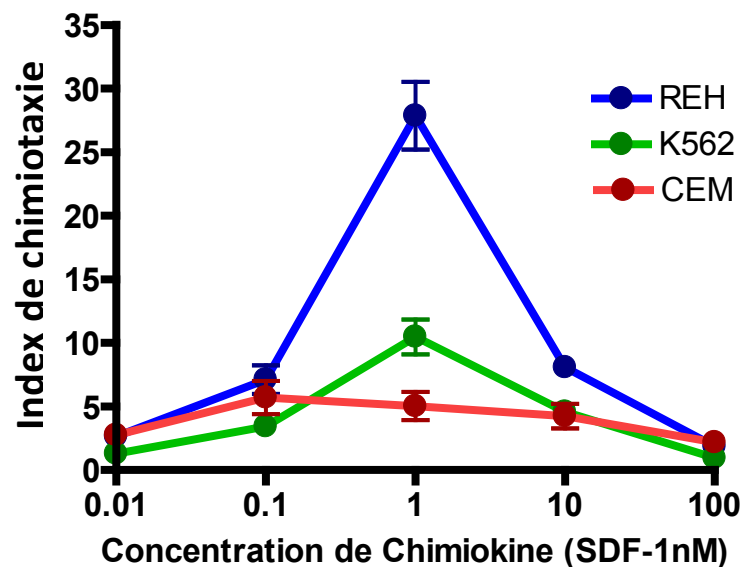


**Figure 3.2.2 Expression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 au niveau protéique dans différentes lignées leucémiques.**  $5 \times 10^6$  cellules K562 ont été incubées avec l'anticorps anti-CXCR4PE ou anti-CXCR7PE durant 30 minutes, avec ou sans étape de perméabilisation préalable (Cytofix/Cytoperm™ de BD), avant d'être examinés par FACScalibur. La fluorescence dans la bande FL-2 indique la présence de récepteurs. **A.** Schéma illustrant des résultats bruts typiques obtenus par l'analyse de l'expression des récepteurs avec le cytomètre de flux dépendamment de l'anticorps utilisé (anti-CXCR4 ou anti-CXCR7) et de la perméabilisation. **B.** Expression (Moyenne $\pm$ ESM) au niveau de la protéine de CXCR4 à la surface cellulaire et dans les compartiments intracellulaires de différentes lignées.  $5 \times 10^6$  cellules ont été incubées avec l'anticorps approprié avec (intra) ou sans (surface) perméabilisation et fixation préalable. Le nombre de récepteurs a été obtenu après une standardisation par les billes QuantiBRITE et mesuré par cytométrie en flux (N=8). **C.** Expression (Moyenne $\pm$ ESM) au niveau de la protéine de CXCR4 à la surface cellulaire dans les compartiments intracellulaires de différentes lignées. Les cellules ont été incubées avec l'anticorps approprié avec (intra) ou sans (surface) perméabilisation et fixation préalable. Le nombre de récepteurs a été obtenu après une standardisation par les billes QuantiBRITE et mesuré par cytométrie en flux selon la technique expliqué dans la section matériel et méthodes. (N=8).



### 3.3 : L'efficacité de migration chimiotactique varie en fonction de la lignée cellulaire observée

Le potentiel de chimiotaxie des lignées leucémiques a été mesuré simultanément à la mesure de leurs expressions de CXCR4 et CXCR7 au niveau de l'ARNm. Pour ce faire, les cellules ont été mises en contact avec des gradients de chimiokines de concentration variée sur une plaque de migration munie de puits équipés de membranes poreuses de 5 microns de diamètre. La dose-réponse de la chimiotaxie au travers de la membrane poreuse prend la forme de courbes gaussiennes, en fonction de la concentration de chimiokines, ce qui est attendu. Aussi, la plupart des lignées cellulaires observées ont une migration optimale à une concentration approximative de 1nM de chimiokine SDF-1.



**Figure 3.3 Efficacité de migration vers SDF-1 de différentes lignées leucémiques.** Pourcentage des cellules qui ont migré vers le compartiment inférieur après une incubation de 3 heures, en fonction de la concentration de chimiokines et pour différents types cellulaires (N=4).

On peut observer que l'efficacité de la migration chimiotactique varie en fonction des types cellulaires observés (**Figure 3.3**).

Cette différence entre l'efficacité de migration des lignées leucémiques est importante parce que les lignées leucémiques sont également très différentes dans leurs modèles d'expression respectifs de CXCR4 et CXCR7 (**Figure 3.1 A, B & C**) et que notre objectif est de déterminer la présence d'un lien entre l'expression de CXCR4 et CXCR7 et le potentiel de migration chimiotactique.

Aussi, il est déjà intéressant de comparer la figure **Figure 3.3** avec la **Figure 3.1**. Bien que la technique d'amplification de l'ARN par PCR utilisée à la **Figure 3.1** ne soit pas quantitative et ne mène pas à une amplification linéaire, on peut néanmoins observer des liens entre les patrons d'expressions générales des cellules leucémiques et leurs efficacités de migration. Par exemple, le type cellulaire qui tend à exprimer le plus haut niveau relatif d'ARNm CXCR4 (lymphocyte pré-B REH) tend également à migrer de façon plus efficace. L'inverse est observé pour les CEM, qui ont la plus faible expression de CXCR4 et le plus petit potentiel chimiotactique. On peut observer une relation inverse en ce qui concerne CXCR7. Le type cellulaire qui tend à exprimer le plus haut niveau relatif d'ARNm CXCR7 (lymphoblaste T CEM) tend à migrer faiblement. L'inverse est observé pour les cellules REH, qui ont la plus faible expression de CXCR7 et le potentiel chimiotactique le plus élevé.

### **3.4.1 : La quantité des récepteurs CXCR4 et CXCR7 exprimée au niveau protéique est hautement variable dans les cellules leucémiques.**

Dans cette étude partie de l'étude, nous démontrons que le niveau d'expression des récepteurs de chimiokines CXCR4 et CXCR7 est instable dans les cellules leucémiques étudiées. Nous sommes arrivés à cette conclusion parce que la mesure quantitative des récepteurs à la surface cellulaire et dans les compartiments intracellulaires change de façon significative (test rANOVA,  $p$  value = 0.0032) d'une expérience à l'autre, et ce, sans que les conditions expérimentales soient différentes. Pour nous assurer que cela n'était pas dû à une erreur expérimentale dans la mesure, nous avons comparé le niveau d'expression de récepteurs contrôles, dont l'expression relative est demeurée stable entre les expériences. Un exemple est exposé à la **Figure 3.4A** : ou l'expression du marqueur contrôle CD45 dans les cellules leucémiques perméabilisées varie très peu d'une expérience à l'autre en comparaison avec CXCR4 et CXCR7 (test T de Student,  $p$  value = 0.0203). Le marqueur CD45 est utilisé parce que c'est un récepteur contrôle présent en abondance dans tous les leukocytes (220) et parce qu'il démontre de façon efficace la validité de la méthode utilisée pour mesurer les récepteurs.

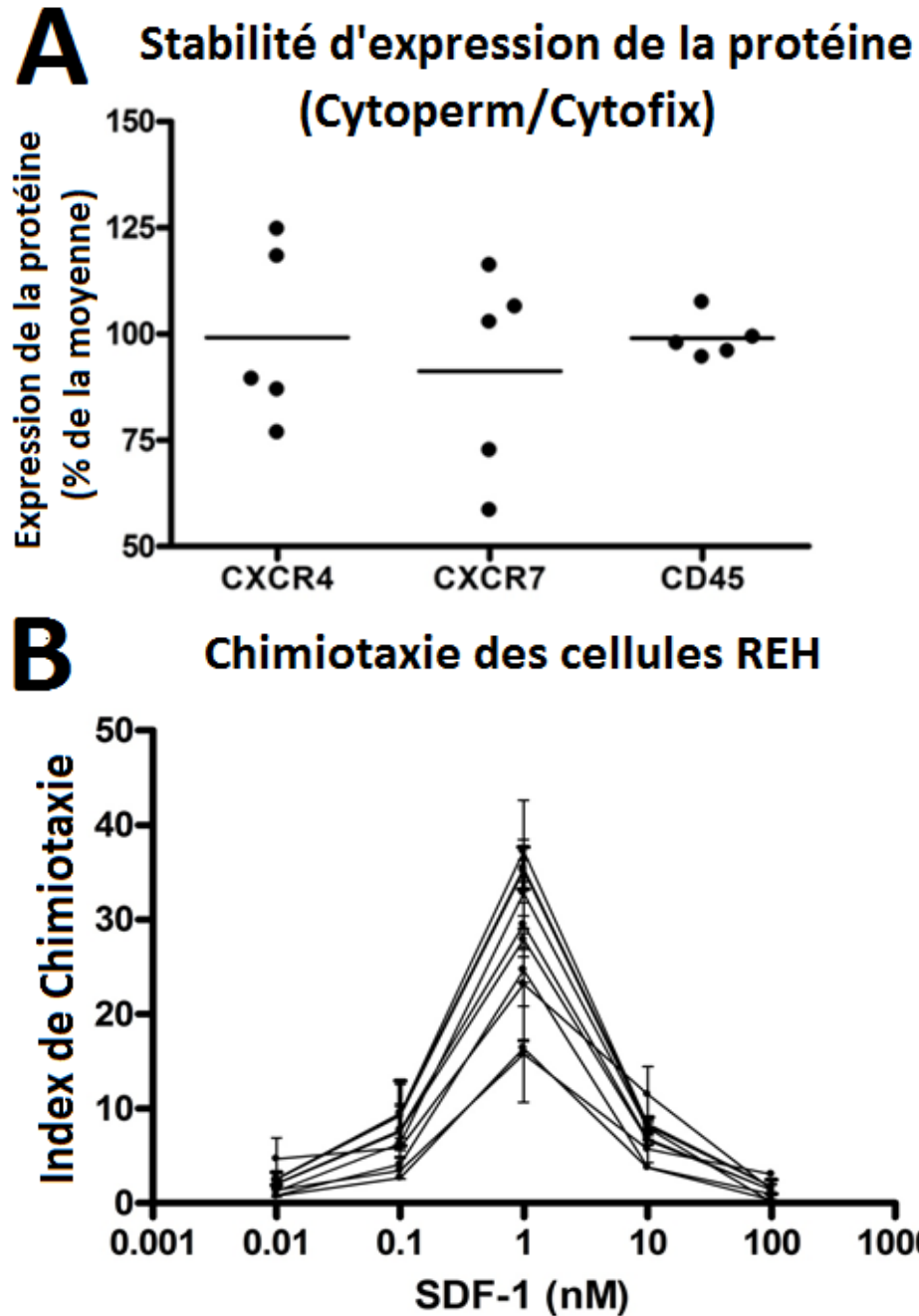
Cette variation entre les expériences dans l'expression de CXCR4 et CXCR7 est importante parce que nous sommes intéressés à déterminer l'existence d'une corrélation entre la capacité de migration des cellules et leurs niveaux d'expression de CXCR4 et CXCR7.

### **3.4.2 : L'efficacité de la migration chimiotactique est également variable dans cellules leucémiques.**

La variabilité observée dans l'expression des récepteurs de SDF-1 nous a poussés à examiner la possibilité qu'il existe aussi une variabilité dans le potentiel de migration dirigée des cellules leucémiques.

L'analyse de l'efficacité de migration a révélé que le potentiel migratoire des cellules varie lui aussi de façon importante entre les expériences, et ce, malgré des conditions constantes et une confluence stable, tel que démontré par des expériences répétées sur la même lignée cellulaire à des moments différents (**Figure 3.4B**).

Cette observation nous a menés à l'hypothèse qu'il existe un lien entre les quantités exprimées des récepteurs CXCR4 et CXCR7 et l'efficacité de migration chimiotactique des cellules. Dans le but de répondre à cette hypothèse, nous avons examiné dans la section 3.5 s'il existe une corrélation entre le niveau d'expression de CXCR4, le niveau d'expression de CXCR7 et l'efficacité de chimiotaxie des cellules vers SDF-1.



**Figure 3.4** Variations de l'expression des récepteurs et de l'efficacité de chimiotaxie chez les REH au cours d'une période de 30 jours.  $5 \times 10^6$  cellules K562 ont été marquées par des anticorps spécifiques liés au fluorochrome PE et examinés par cytométrie en flux. Les valeurs ont été converties en nombre de récepteurs absolus grâce aux billes de standardisation Quantibrite et rapportées en pourcentage de la moyenne. Les mesures ont été espacées de 3 à 5 jours. L'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 varie significativement plus que l'expression du marqueur contrôle CD45 entre les expériences (test T de Student, two-tailed, 0.95, p value = 0.0203) (N = 5).

### **3.5 : La meilleure corrélation du potentiel migratoire de cellules leucémiques étudiées envers SDF-1 est le ratio entre les mesures de CXCR4 en surface cellulaire et CXCR7 en milieu intracellulaire.**

La variation importante de l'expression des récepteurs de chimiokines et du potentiel de migration vers CXCL12 des lignées cellulaires étudiées nous a poussé à examiner les liens existant entre la population des récepteurs et le phénotype chimiotactique. Aussi, la mesure, par cytométrie en flux, du niveau d'expression des récepteurs, dans les compartiments de surface autant que intracellulaires, a été comparée avec celle du potentiel chimiotactique des cellules étudiées dans le but d'établir une corrélation.

Les cellules leucémiques pré-B REH ont été utilisées pour la majorité des prises de données lors de cette étape. La raison pour l'utilisation des cellules REH est que leur puissante migration chimiotactique vers SDF-1 permet de mieux apprécier la variabilité de l'efficacité de la migration entre les expériences. Additionnellement, les REH résistent bien aux 3 heures d'expérimentation. Toutefois, l'étude de la corrélation entre l'expression des récepteurs et le potentiel de migration a quand même été effectuée sur d'autres lignées leucémiques, telles que les cellules leucémiques myéloïdes K562, dans le but de confirmer que le phénomène observé ne se limite pas aux seuls REH ou aux lymphoblastes pré-B. Ces expériences ont donné des résultats comparables à ceux obtenus avec les REH (mais avec un facteur de signifiante inférieur).

L'étude des récepteurs CXCR4 présents à la surface cellulaire des lymphocytes REH a permis d'établir une corrélation significative avec l'efficacité de la migration chimiotactique vers CXCL12 (**Figure 3.5.1A**). En effet, les quantités de CXCR4 détectées à la surface membranaire corrélaient positivement avec la réponse migratoire (**Figure 3.5.1A** et **Figure 3.5.2A**). Ceci supporte l'hypothèse que CXCR4 serait directement responsable de la migration vers CXCL12. Par contre, le potentiel de corrélation entre la migration et les quantités de CXCR4 détectées en surface reste limité.

Il est important de noter qu'il est impossible d'effectuer le même genre de rapprochement avec les récepteurs CXCR7 en surface, parce que les quantités de CXCR7 détectés à la surface membranaire sont négligeables (**Figure 3.2.2C**).

Les quantités de récepteurs CXCR7 exprimés et retenus dans les compartiments intracellulaires ne sont mesurables qu'après perméabilisation. Toutefois, la mesure des quantités de CXCR7 situés dans les réserves intracellulaires ne permettent pas, de façon indépendante, de tirer de corrélations statistiquement significatives avec le phénotype des cellules à l'étude (**Figure 3.5.1B** et **Figure 3.5.2B**).

De la même façon, la mesure indépendante des quantités de CXCR4 situées dans les réserves intracellulaires ne permet pas non plus de tirer de corrélations statistiquement significatives (**Figure 3.5.1C**).

Cependant, une corrélation de puissance supérieure a été obtenue par l'étude simultanée des deux récepteurs. En effet, une division des quantités de CXCR4 présentes en surface par la quantité de CXCR7 présente dans les vésicules

intracellulaires nous a permis d'obtenir le ratio CXCR4<sub>extra</sub>/CXCR7<sub>intra</sub>, lequel corrèle positivement et quantitativement d'une façon très significative avec le potentiel de migration vers CXCL12 (**Figure 3.5.1D** et **Figure 3.5.2C**). Aussi, cette technique donne des résultats prédictifs supérieurs dans les deux types cellulaires à l'étude. En comparaison, ni le ratio CXCR4 intracellulaire / CXCR7 intracellulaire (**Figure 3.5.1E**), ni le ratio CXCR4 en surface / CXCR4 intracellulaire (**Figure 3.5.1F**) n'ont permis d'obtenir de corrélation statistiquement significative. La meilleure corrélation du potentiel migratoire de cellules leucémiques étudiées envers SDF-1 semble donc être le ratio entre les mesures de CXCR4 en surface cellulaire et CXCR7 en milieu intracellulaire.

Il est à noter que dans l'étude de la lignée REH, la mesure des récepteurs est exprimée en nombre de molécules par cellule, plutôt qu'une mesure relative de la fluorescence, grâce à une méthode de Cytométrie en flux quantitative (CMFQ) qui nécessite l'utilisation de billes de standardisation Quantibrite®. Cette méthode est souhaitable parce qu'elle permet de compenser pour les influences externes qui affectent la mesure de la fluorescence telle que la configuration de l'instrument, le nombre de volts sur les détecteurs, la configuration du banc optique, le pH, etc... [199]. Toutefois, cette méthode peut être utilisée exclusivement en combinaison avec des anticorps liés à la phycoérythrine 11 (PE).



**A**

Index de chimiotaxie

**B**

Index de chimiotaxie

**C**

Index de chimiotaxie

**D**

Index de chimiotaxie

**E**

Index de chimiotaxie

**F**

Index de chimiotaxie

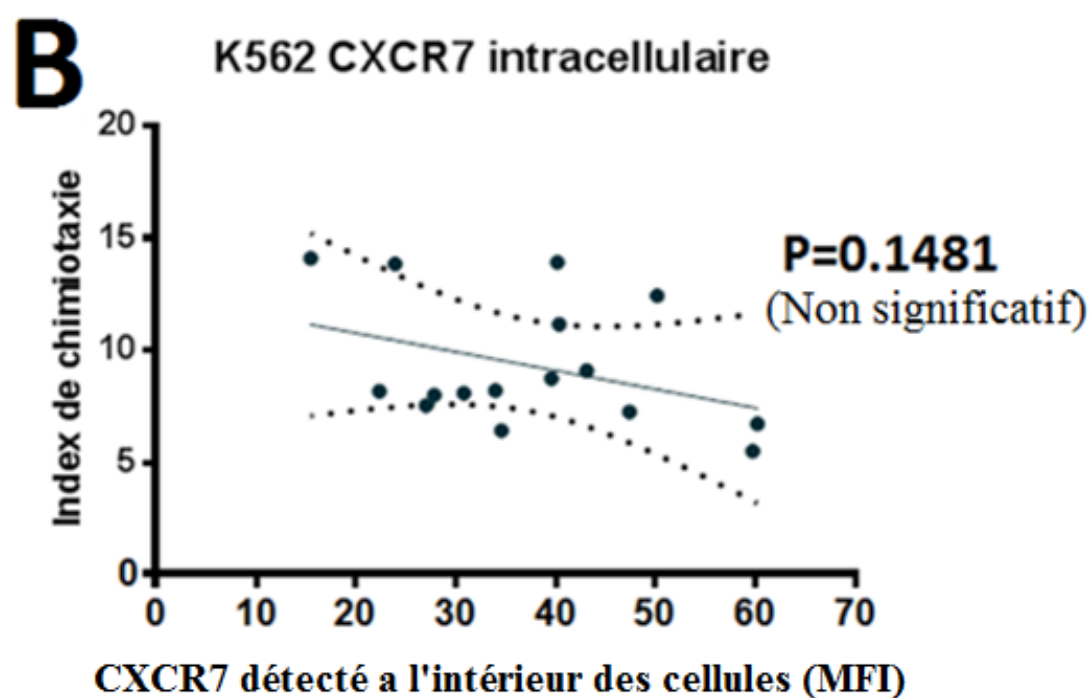
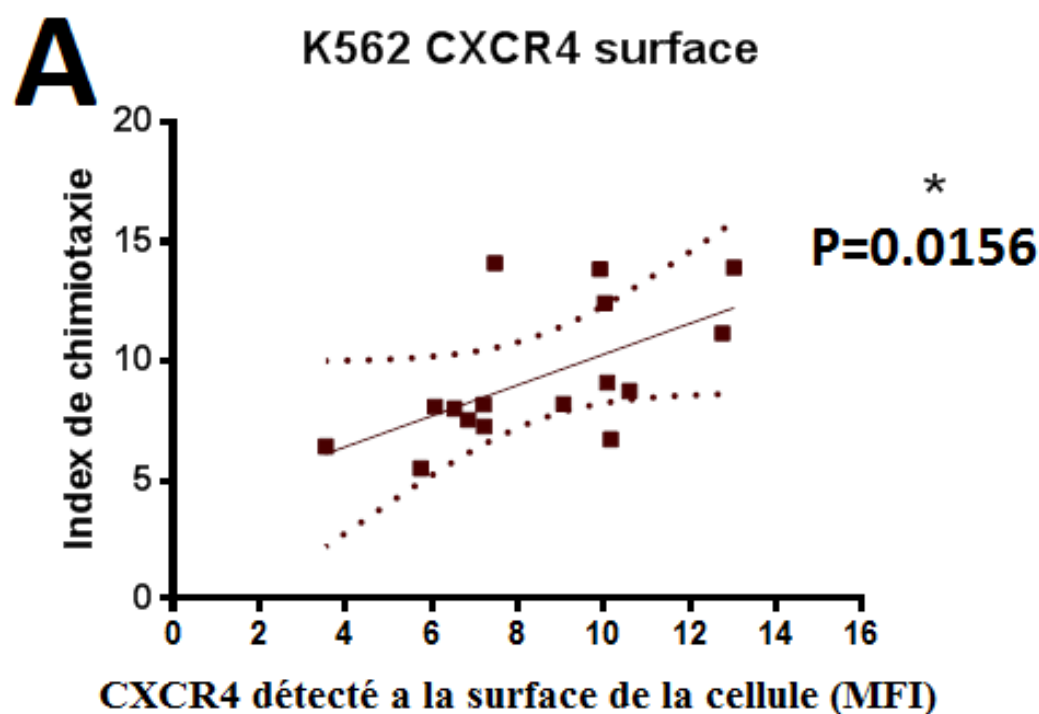
**Figure 3.5.1 Corrélation entre le potentiel de migration et l'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 au niveau des protéines dans les REH.** Les cellules leucémiques pré-B comptées dans la chambre inférieure des plaques de migration de 5µm après 3 heures d'incubation à la concentration de SDF-1 optimale pour la chimiotaxie ont été corrélées avec le ratio des quantités de récepteurs CXCR4 extracellulaire et CXCR7 intracellulaire mesurés par cytométrie en flux. La courbe représente un test de régression linéaire appliqué aux résultats qui dispose d'un intervalle de confiance de 95 % illustré par les pointillés. Le coefficient de corrélation de Pearson ( $P=$ ) mesure la qualité de la relation linéaire entre les deux échantillons et une valeur inférieure à 0.05 représente une corrélation statistiquement significative. La force de la corrélation augmente lorsque le coefficient de corrélation ( $P=$ ) se rapproche de zéro. Chaque point représente une expérience. **(A)** Le niveau d'expression membranaire de CXCR4 possède, seul, un potentiel de corrélation significatif mais limité. **(B)** La quantité de CXCR7 présent dans les réserves intracellulaires ne corrèle pas significativement avec le phénotype chimiotactique des cellules REH. **(C)** La quantité de CXCR4 présent dans les réserves intracellulaires ne corrèle pas significativement avec le phénotype chimiotactique des cellules REH. **(D)** Le ratio d'expression entre le récepteur CXCR4 extracellulaire et le récepteur CXCR7 intracellulaire (CXCR4/CXCR7) mesuré par cytométrie en flux possède une signification statistique supérieure dans la prédiction du phénotype migratoire chez les REH. **(E)** Le ratio d'expression entre le récepteur CXCR4 intracellulaire et le récepteur CXCR7 intracellulaire (CXCR4/CXCR7) mesuré par cytométrie en flux ne corrèle pas significativement avec l'efficacité de migration. **(F)** Le ratio d'expression entre le récepteur CXCR4 intracellulaire et le récepteur CXCR4 intracellulaire (CXCR4/CXCR7) mesuré par cytométrie en flux ne corrèle pas significativement avec l'efficacité de migration chimiotactique dans les cellules REH.

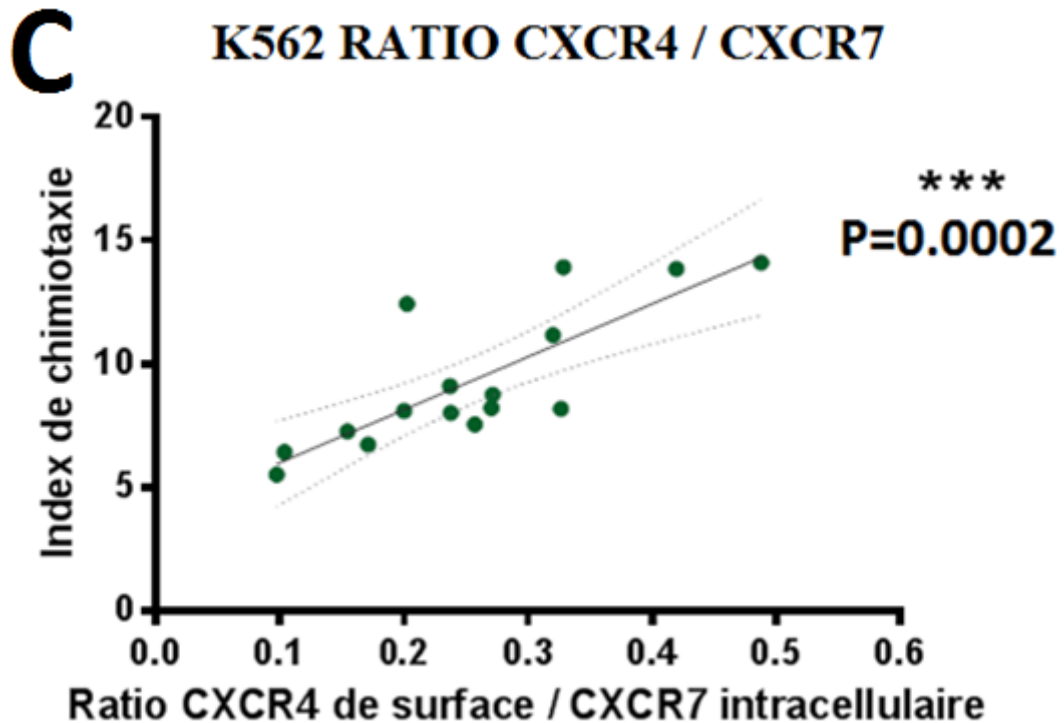
Pour nous assurer que les corrélations observées dans l'analyse des REH n'étaient pas limitées à cette lignée cellulaire, nous avons reproduit notre analyse dans une lignée cellulaire différente. Les cellules myéloïdes indifférenciées K562 ont été utilisées lors de cette étape. La raison qui justifie l'utilisation des K562 est que les K562 possèdent un fort potentiel de migration vers CXCL12, une réponse chimiotactique stable, une corrélation CXCR4<sub>surface</sub>/CXCR7<sub>intra</sub> VS migration très significative et une population modérée de chacun des deux récepteurs (comparativement aux REH, qui produisent très peu de CXCR7), ce qui en fait un modèle d'étude idéal. De plus, les K562 résistent bien à la transfection par nucléofection, ce qui nous a permis d'entreprendre l'analyse des effets de la surexpression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans l'étape subséquente du projet. En comparaison, les cellules REH se sont montrées très vulnérables à toutes les techniques de transfection, et spécialement la nucléofection, avec des taux de mortalité inacceptable rendant l'étude de leurs comportements très difficile et une surexpression de qualité inacceptable chez les cellules survivantes.

Des anticorps couplés à des fluorochromes –APC ont été utilisés dans cette étape. Cette décision a été prise dans le but de faciliter la comparaison des résultats obtenus dans les K562 avec les résultats de la surexpression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans l'étape subséquente du projet. En effet, le tag fluorescent rapporteur –YFP nécessaire à la détection de la surexpression de CXCR7 émet dans les mêmes longueurs d'onde que le fluorochrome –PE, il était donc nécessaire d'utiliser un autre type de fluorochrome. Il aurait été possible d'utiliser un autre type de gène rapporteur, mais étant donné que la corrélation du ratio

CXCR4<sub>surface</sub>/CXCR7<sub>intracellulaire</sub> avec la migration cellulaire demeure semblable avec les deux types de fluorochromes, cela n'a pas semblé nécessaire. Il est à noter que les anticorps reliés au fluorochromes proviennent du même clone. Pour ces raisons, les billes de standardisation Quantibrite® ne sont pas utilisées dans les expériences menées sur les K562, et la mesure des récepteurs est rapportée en fluorescence relative (MFI) obtenue par des anticorps APC.

De la même façon que lors de la précédente étape du projet de recherche, le ratio entre les récepteurs CXCR4 membranaires et CXCR7 intracellulaires offre une corrélation supérieure envers le potentiel de migration vers SDF-1 que l'étude des récepteurs CXCR4 membranaires et CXCR7 intracellulaires pris séparément (**Figure 3.5.2A, Figure 3.5.2B et Figure 3.5.2C**). Ceci démontre que les observations effectuées précédemment sur les cellules REH sont reproductibles dans différentes lignées leucémiques et que l'utilisation d'un différent fluorochrome n'affecte pas les conclusions obtenues.





**Figure 3.5.2** Corrélation entre le potentiel de migration et l'expression au niveau des protéines des récepteurs CXCR4 et CXCR7 dans les K562. Les cellules myéloïdes K562 comptées dans la chambre inférieure des plaques de migration Boyden de 5µm après 3 heures d'incubation à la concentration de SDF-1 optimale pour la chimiotaxie ont été corrélées avec le ratio des quantités de récepteurs CXCR4 extracellulaire et CXCR7 intracellulaire mesurés par cytométrie en flux. La courbe représente un test de régression linéaire appliqué aux résultats qui dispose d'un intervalle de confiance de 95 % illustré par les pointillés. Le coefficient de corrélation de Pearson ( $P=$ ) mesure la qualité de la relation linéaire entre les deux échantillons et une valeur inférieure à 0.05 représente une corrélation statistiquement significative. La force de la corrélation augmente lorsque le coefficient de corrélation ( $P=$ ) se rapproche de zéro. (A) Le niveau d'expression membranaire de CXCR4 possède, seul, une corrélation significative mais limitée. ( $P=0.0156$ ) (B) La quantité de CXCR7 présent dans les réserves intracellulaires ne corrèle pas significativement avec le phénotype chimiotactique des cellules K562. ( $P=0.1481$ ) (C) Le ratio d'expression entre le récepteur CXCR4 extracellulaire et le récepteur CXCR7 intracellulaire (CXCR4/CXCR7) mesuré par cytométrie en flux possède une signifiante statistique supérieure dans la prédiction du phénotype migratoire chez les K562. ( $P=0.0002$ )

### **3.6 : La surexpression du récepteur CXCR7 réduit la migration vers SDF-1 dans les cellules transfectées**

Pour vérifier si l'effet négatif observé sur la migration correspondant à des hauts niveaux de CXCR7 intracellulaire peut être reproduit par la surexpression ectopique de CXCR7, nous avons transfecté des cellules leucémiques myéloïdes indifférenciées K562 avec un plasmide de surexpression qui inclut un gène rapporteur de type protéine fluorescente jaune (CXCR7-YFP). La transfection optimale a été obtenue par nucléofection. D'autres types de transfection ont été tentés, mais ont provoqué des résultats inférieurs ou insatisfaisants.

Suite à toutes les transfections, les cellules surexprimant le plasmide transfecté ont été sélectionnées pour l'analyse par leurs fluorescences particulières sur l'axe FL-2 (YFP) du cytomètre en flux (**Figure 3.6A et 3.6B**).

Comme il est attendu, on peut observer que les cellules qui surexpriment le plasmide transfecté CXCR7-YFP démontrent également une forte augmentation de leurs expressions de CXCR7, ce qui est mis en évidence sur l'axe FL-4 du cytomètre en flux grâce à l'utilisation d'anticorps anti-CXCR7-APC (**Figure 3.6C**).

Les cellules K562 ayant été transfectées par un plasmide contrôle –YFP ont ensuite été analysés dans le cadre d'expériences de migration et comparés à des cellules K562 non-transfectées. Le comportement chimiotactique observé et la corrélation CXCR4<sub>surface</sub>/CXCR7<sub>intracellulaire</sub> VS migration mesurée est très semblable aux cellules non-transfectées (**Figure 3.6D**). Ceci démontre que les modifications imposées aux cellules dans le cadre de cette étape du projet, tel que la

nucléofection, la transfection d'un plasmide et la surexpression d'une protéine contrôle fluorescente jaune (YFP) n'ont pas affecté le taux de migration ou le ratio de récepteurs. On peut donc en déduire que le modèle expérimental ne produit pas d'artefacts relatifs au taux de migration et à la population de récepteurs des cellules étudiées.

Contrairement à la surexpression du plasmide contrôle, la surexpression du récepteur CXCR7 a profondément modifié le comportement des cellules. En effet, on peut observer que la surexpression de CXCR7 provoque des niveaux très élevés du récepteur CXCR7 et un potentiel de migration vers SDF-1 très faible (**Figure 3.6E**). La surexpression de CXCR7 affecte également fortement le ratio  $CXCR4_{\text{surface}}/CXCR7_{\text{intra}}$  en augmentant la quantité de récepteurs CXCR7 présent (**Figure 3.6G**).

Il est important de comprendre que les cellules qui surexpriment le plasmide CXCR7-YFP sont analysées par leurs fluorescences sur l'axe FL-2 lors des analyses effectuées à l'aide du cytomètre en flux, mais qu'elles ne peuvent pas être physiquement séparées des cellules non-transfectées lors des expériences de migration. Ainsi, toutes les cellules présentes dans le puits de migration ne surexpriment pas CXCR7-YFP. Elles sont sélectivement analysées post-migration après la récupération du contenu des puits de migration et le passage des cellules récupérées au cytomètre en flux, ce qui permet de déterminer le taux de migration des cellules qui surexpriment CXCR7-YFP, et de le comparer à celui des cellules qui ne le surexpriment pas.

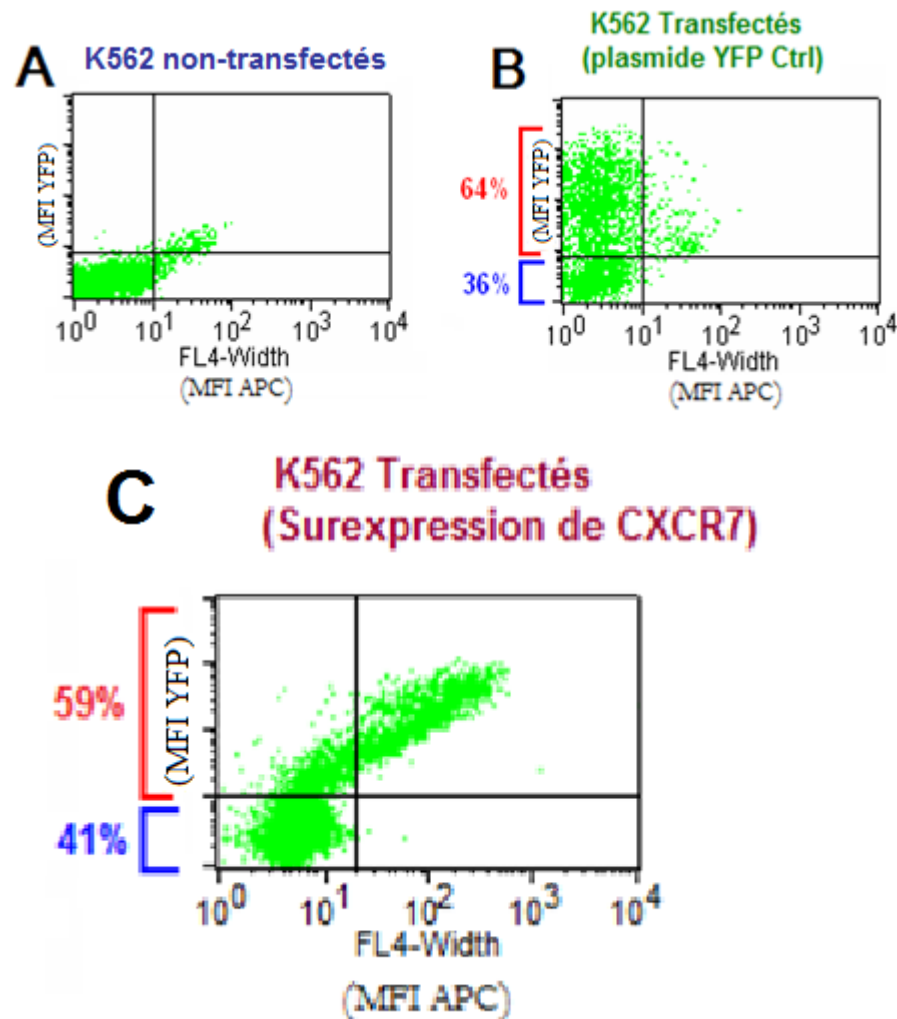


Or, cette surexpression de CXCR7-YFP correspond à une réduction très significative du potentiel de migration de cellules concernées, mais pas des cellules non-transfectées avoisinantes (**Figure 3.6G et Figure 3.7.1**). En fait, les cellules partageant le même puits de migration de 29ul que les cellules surexprimant fortement le plasmide CXCR7-YFP semblent même paradoxalement démontrer un taux de migration supérieur aux cellules contrôles.

En contrepartie à ces observations, la surexpression de CXCR4 n'a pas provoqué de changements significatifs dans le potentiel de chimiotaxie des cellules étudiées (**Figure 3.6F**). La surexpression du plasmide CXCR4-YFP altère significativement et d'une façon positive le ratio  $CXCR4_{surface}/CXCR7_{intra}$  en augmentant les quantités de CXCR4, mais pas de CXCR7. Toutefois, cette surexpression ne semble pas provoquer d'augmentation correspondante dans le potentiel de migration de cellules concernées. Il est, par contre, intéressant et important de noter que les protéines CXCR7-YFP et CXCR4-YFP surexprimées dans les lymphocytes à l'étude ne co-localisent pas complètement avec les récepteurs naturels. Par exemple, suite à la surexpression du CXCR7-YFP dans les cellules REH et K562, de fortes quantités de CXCR7 ont été localisées à la surface membranaire des cellules. Ceci peut s'expliquer par la saturation des mécanismes de recyclage et d'internalisation de CXCR7. Mais il ne faut pas écarter la possibilité que l'étiquette -YFP modifie le comportement des récepteurs surexprimés.

Il est également intéressant de constater que la surexpression de CXCR7-YFP provoque des modulations opposées sur les cellules qui surexpriment CXCR7 et les cellules non-transfectées avoisinantes. Cet état de fait pourrait expliquer les

difficultés de l'évaluation de l'effet de CXCR7 in vivo, et les contradictions parfois présentes dans la littérature sur le rôle de CXCR7. Par exemple : (196, 203,214) Versus (204, 213). En effet, si les cellules transfectées et non-transfectées n'avaient pas été récupérées et étudiées séparément post-migration, la moyenne du potentiel de migration du mélange cellulaire aurait semblé avoir augmentée suite à la surexpression de CXCR7, une observation qui aurait mené à des conclusions erronées sur le rôle de CXCR7 dans la migration vers SDF-1. Aussi, il est justifié de croire qu'un niveau de CXCR7 élevé dans un échantillon cellulaire puisse mener à une forte ou une faible migration globale, dépendamment du contexte de migration, du milieu et des techniques d'analyse.



**D**

Index de chimiotaxie

**F**

Index de chimiotaxie

**F**

Index de chimiotaxie

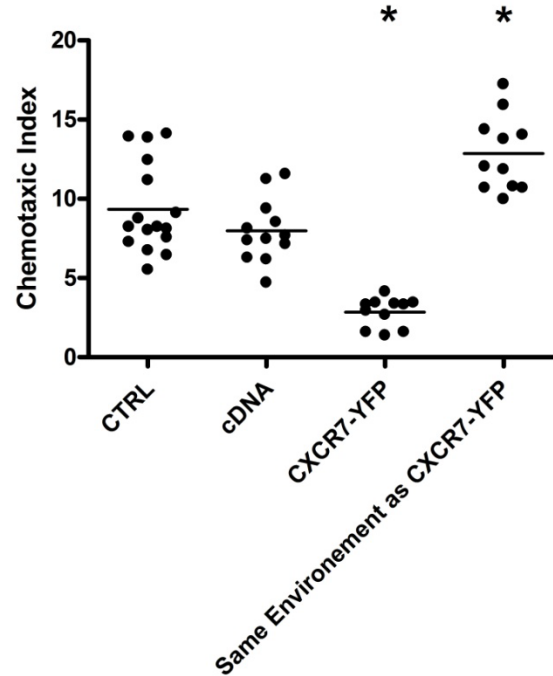
**Figure 3.6 Effet de la transfection et de la surexpression du plasmide CXCR7-YFP sur la migration des K562 *in-vitro*.** Les cellules myéloïdes K562 ont été comptées dans la chambre inférieure du puits de migration après 3 heures d'incubation à une concentration optimale de SDF-1 de 1nM. Les résultats ont ensuite été corrélés avec l'expression extracellulaire et intracellulaire des récepteurs chimiotactiques. (A) Résultat brut typique obtenu en cytométrie de flux avec des K562 non-transfectées. (B) La transfection du plasmide contrôle dans les cellules K562 produit une fluorescence dans la bande FL-2 du cytomètre de flux lorsque le tag -YFP est surexprimé, ce qui nous permet d'analyser sélectivement les cellules transfectées (C) La transfection du plasmide CXCR7-YFP dans les cellules K562 produit une augmentation dans l'expression de CXCR7 uniquement dans les cellules transfectées. (D) La transfection du plasmide contrôle -YFP ne provoque pas de déviation observable du phénotype chimiotactique chez les K562. Une corrélation est encore présente entre le ratio CXCR4<sub>surface</sub>/CXCR7<sub>inta</sub> avec le test de coefficient de corrélation de Pearson (P value=0.0088) (E) Les cellules K562 transfectées qui surexpriment le plasmide CXCR7-YFP possèdent de grandes quantités de CXCR7 et un très faible et potentiel de migration vers SDF-1. (F) Les cellules K562 transfectées qui surexpriment le plasmide CXCR4-YFP possèdent de grandes quantités de CXCR4 mais un potentiel de migration vers SDF-1 qui se situe dans la distribution des cellules contrôles. (G) Les cellules K562 qui surexpriment le plasmide CXCR7-YFP possèdent un ratio CXCR4/CXCR7 très faible et potentiel de migration vers SDF-1 fortement réduit.

**3.7 : La surexpression de CXCR7 augmente la migration chimiotactique au travers de la membrane poreuse dans les cellules avoisinantes**

**A**

Index de chimiotaxie

**B**



**Figure 3.7.1 Augmentation de la migration chimiotactique des cellules partageant le même environnement que les K562 qui surexpriment CXCR7.** Le potentiel de migration chimiotactique *in vivo* a été analysé pour différents types

de transfections. Les cellules myéloïdes K562 ont été comptées dans la chambre inférieure du puits de migration après 3 heures d'incubation à une concentration optimale de SDF-1 de 1nM. Les résultats ont ensuite été corrélés avec l'expression extracellulaire et intracellulaire des récepteurs chimiotactiques. Les résultats présentés pour les cellules contrôles et pour les cellules transfectées sont les mêmes qu'à la Figure 3.6G. **(A)** Les cellules non-transfectées qui partagent le puits de migration des cellules K562 qui surexpriment CXCR7 démontrent une efficacité de migration accrue, sans que cela ne corrèle avec leurs ratios CXCR4/CXCR7 n'en soit affecté. **(B)** Graphe de l'efficacité de migration des cellules présentées à la figure 3.7A. La migration des cellules transfectées par un plasmide contrôle ne sont pas affectées de façon significative par la transfection. Les cellules surexprimant CXCR7-YFP font preuve d'une diminution importante de la migration. Les cellules non-transfectées partageant le puits de migration des CXCR7-YFP ont démontré une efficacité de migration significativement plus élevée que les cellules contrôles ( $P \leq 0.0001$ , *unpaired student T test*,  $n=11$ ). Ces résultats sont considérés par convention comme extrêmement significatifs.

Lors de la précédente étape du projet, des cellules K562 surexprimant CXCR7 ont été en contact avec des cellules K562 non-transfectées dans le cadre d'expériences sur l'efficacité de la migration chimiotactique. La raison pour cela est qu'il est difficile au niveau pratique de séparer les cellules surexprimant CXCR7 des cellules non-transfectées, et qu'il est plus facile d'analyser les différents groupes de cellules à la suite de la migration en se basant sur leurs fluorescence respective par cytométrie de flux.

Il était attendu que les cellules non-transfectées démontrent une efficacité de migration similaire aux cellules des expériences contrôles. Toutefois, contrairement à ce qui était attendu, nous avons observé que les cellules K562 non-transfectées qui migrent en contact rapproché (dans le même puits de migration) avec les cellules K562 surexprimant CXCR7 migrent de façon plus efficace que la normale (**Figure 3.6G** et **Figure 3.7.1**).

La raison pour laquelle ceci est important est qu'il est difficile d'analyser les cellules d'une population leucémique en se basant sur l'expression des récepteurs de chaque cellule individuelle. Dans certains résultats publiés dans la littérature, l'expression et la surexpression de CXCR7 sont mesurées pour la moyenne de l'ensemble des cellules et des conclusions sont tirées sans mentionner si des cellules non-transfectées se trouvent dans la population analysée [170] [181].

La possibilité que CXCR7 puisse posséder un double rôle sur la migration (un effet anti-migratoire sur les cellules qui surexpriment CXCR7 et un effet pro-migratoire sur les cellules non-transfectées qui partagent le milieu de migration) nous a poussés à examiner la nature de la régulation que peut exercer CXCR7 sur les cellules avoisinantes. Plus particulièrement, nous avons cherché à déterminer si les récepteurs CXCR7 surexprimés exercent leur influence d'une façon directe, tel que par le contact cellulaire, ou si un mécanisme de régulation indirect est mis en cause, tel que la sécrétion d'un intermédiaire dans le milieu extracellulaire, ou un contrôle des éléments nécessaires à la migration disponible dans l'environnement (tel que la concentration de chimiokines CXCL12 se trouvant dans le puits). L'effet de la surexpression de CXCR7 a été étudié sous diverses circonstances et dans divers milieux.

Des cellules de type HEK ont été utilisées lors de cette étape. La raison pour laquelle des cellules HEK ont été utilisées est que les HEK expriment le récepteur CXCR7 à leurs surfaces cellulaires, mais pas CXCR4. Les HEK sont également incapables de migrer au travers des pores de 5µM de la membrane poreuse des puits

de migration [200]. Cependant, leur présence n'interfère pas avec la migration des cellules avoisinantes.

Ainsi, dans l'hypothèse que la migration des lymphocytes est augmenté par la présence avoisinante de récepteurs CXCR7 fonctionnels dans le puits de migration supérieur, l'ajout de cellules HEK non-migratoires mais qui expriment CXCR7 devrait provoquer le même effet que la surexpression de CXCR7 dans les cellules K562. Nous avons également surexprimé le CXCR7 pour atteindre des niveaux d'expression supérieurs.

Aucune augmentation significative de la migration n'a pu être mesurée en simple présence de cellules HEK non transfectées (**Figure 3.7.2**). Toutefois, les cellules HEK surexprimant CXCR7 ont provoqué une augmentation mesurable dans la migration des cellules avoisinantes. Ceci peut suggérer deux choses : soit le niveau naturel de CXCR7 en surface chez les HEK est insuffisant pour provoquer une modulation de la migration, alors que les niveaux plus élevés atteints par la surexpression sont suffisants. Soit le CXCR7 surexprimé agit différemment sur les cellules avoisinantes que le CXCR7 wild-type présent à la surface des HEK.

Toutefois, ces observations apportent une information supplémentaire : le récepteur CXCR4 n'est pas nécessaire pour l'effet observé du CXCR7. En effet, les cellules HEK n'expriment peu ou pas de CXCR4, mais ont quand même produit un effet pro-migratoire suite à la surexpression de CXCR7.

Le même phénomène a été observé avec les cellules REH qui partageaient leurs puits de migration avec les cellules HEK. Ceci est une information importante, car

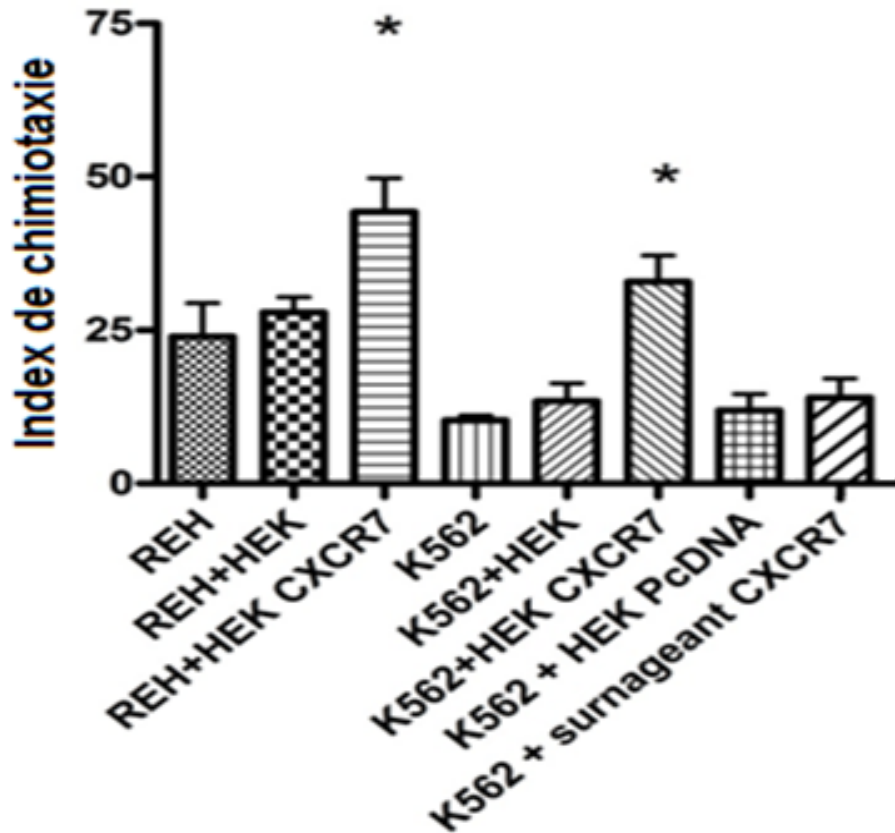


nous n'avons pas pu effectuer les tests de surexpression de CXCR7 sur les REH. Ces résultats (``REH +HEK surX7``) démontrent que malgré leur récalcitrance à exprimer CXCR7, les REH sont affectées par l'effet du CXCR7 sur la migration de la même façon que les cellules K562.

Le même effet a pu être observé en utilisant un plasmide de surexpression qui ne contient pas le tag -YFP. Ceci démontre que le tag -YFP n'est pas responsable d'une aberration dans la conformation, dans l'action ou dans la localisation du récepteur CXCR7.

Des cellules HEK surexprimant CXCR7-YFP ont également été incubées dans le médium de migration durant 30 minutes. Le surnageant a ensuite été collecté et utilisé dans la migration de cellules K562 normales. Le but de cette expérience était de vérifier si l'action pro-migratoire des cellules surexprimant CXCR7 passait par la sécrétion de facteurs dans le milieu, ou par une modification du milieu de migration. Toutefois, aucun effet n'a pu être observé (**Figure 3.7.2**), ce qui démontre que l'effet pro-migratoire de la surexpression de CXCR7 ne passe pas par la sécrétion de molécules dans le médium de migration.

## Chimiotaxie vers 1nM SDF-1



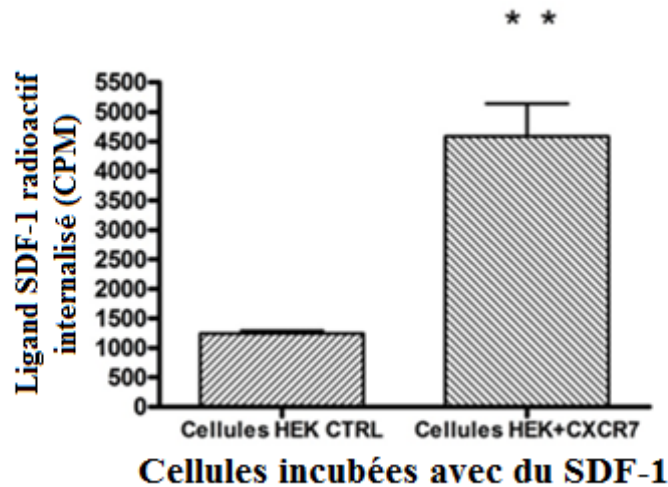
**Figure 3.7.2** Effet de l'addition de cellules non-migratoires, exprimant CXCR7 (HEK) et surexprimant CXCR7 (HEK+CXCR7) dans le milieu de migration des cellules leucémiques.  $5 \times 10^5$  cellules HEK tripsynisées exprimant CXCR7 (mais pas CXCR4) ont été ajoutées dans le puits supérieur d'une plaque d'essai migratoire de 96 puits, sans que cela n'affecte la migration des REH (REH+HEK) ou des K562 (K562+HEK). Le même nombre de cellules HEK tripsynisées, mais qui surexpriment CXCR7-YFP, augmente le potentiel de migration des REH (REH+HEK CXCR7) et des K562 (K562+HEK CXCR7). Le surnageant du milieu de migration des cellules surexprimant CXCR7-YFP n'a produit aucun effet. Le test statistique utilisé est le ``one-way ANOVA`` (analysis of variance). N=3

Pour vérifier la possibilité que les cellules surexprimant CXCR7 augmentent la migration des cellules avoisinantes via la fabrication, la séquestration, la dégradation ou le contrôle de la concentration de CXCL12, nous avons utilisé un isotope radioactif de la chimiokine (CXCL12-I<sub>125</sub>) pour mesurer la vitesse et le degré de l'internalisation et la dégradation du pool de chimiokines durant une période de 30 minutes. La raison pour cela est que le ligand radioactif, facile à détecter et à quantifier, nous permet d'observer la vitesse à laquelle le SDF-1 ambiant est internalisé.

Aussi, on observe que les cellules HEK qui surexpriment CXCR7 internalisent le ligand CXCL12 beaucoup plus rapidement que les cellules HEK contrôles (**Figure 3.7.3**). Ceci démontre que le récepteur surexprimé CXCR7-YFP est fonctionnel et suggère la possibilité que le récepteur CXCR7 pourrait promouvoir la migration des cellules dans le puits supérieur en maintenant un gradient de concentration constant.

En effet, la chimiotaxie est hautement dose-dépendante et il est logique de croire qu'une diffusion constante du SDF-1 contenu dans le puits inférieur pourrait éventuellement équilibrer les concentrations entre les deux puits. Pour maintenir le gradient, la quantité de CXCL12 doit être contrôlée. Aussi, une élimination des ligands en excès par CXCR7 pourrait permettre une migration soutenue.

### Internalisation du SDF-1 provoqué par la surexpression de CXCR7



**Figure 3.7.3 La surexpression de CXCR7 affecte la migration des cellules leucémiques distantes via la dégradation du SDF-1. (A)** L'internalisation et la dégradation de SDF-1 radioactif marqué à l'iode-125 ont été étudiées par compteur- $\gamma$  après 30 minutes d'incubation avec  $1.5 \times 10^5$  cellules HEK contrôles (HEK CTRL) ou  $1.5 \times 10^5$  cellules HEK surexprimant CXCR7-YFP (HEK+CXCR7). La surexpression de CXCR7 provoque une augmentation massive de l'internalisation de CXCR7 (*unpaired student T test*). N=6

Ensembles, ces résultats suggèrent que le récepteur CXCR7 pourrait avoir deux rôles distincts dans la régulation de la chimiotaxie vers SDF-1 (le premier, via l'internalisation et la dégradation du SDF-1, augmenterait la migration des cellules non-transfectées partageant l'environnement immédiat de migration, et le deuxième qui inhiberait la migration vers SDF-1 des cellules qui surexpriment CXCR7 par un mécanisme inconnu). De plus, ces résultats suggèrent que le ratio d'expression  $CXCR4_{\text{surface}}/CXCR7_{\text{intracellulaire}}$  possède une valeur prédictive importante sur l'efficacité de migration vers SDF-1 des cellules et ouvre la porte à son utilisation comme marqueur de prédiction.

## 4. DISCUSSION

Nous avons poursuivi ce projet de recherche parce que, malgré les progrès constants réalisés dans la prise en charge du cancer, les métastases cancéreuses composées de cellules hématopoïétiques envahissent fréquemment par chimiotaxie les environnements riches en chimiokines SDF-1, tels que la niche de la moelle osseuse ou le foie, pour s'y ancrer. Cet ancrage diminue l'efficacité des traitements anticancéreux et provoquant l'apparition de lésions secondaires fortement nuisibles pour le pronostic des patients [141-144, 146].

Cette migration est dépendante de la régulation des récepteurs de SDF-1 (CXCR4 et CXCR7), lesquels sont impliqués dans le cancer à plusieurs niveaux et constituent une cible thérapeutique très prometteuse.

Toutefois, l'étude intensive mais individuelle du récepteur CXCR4 n'a pas encore permis de maîtriser la régulation des nombreux effets biologiques qui découlent de l'expression des récepteurs de SDF-1. Les bloqueurs de CXCR4, efficaces pour provoquer l'exode des cellules leucémiques nichées dans la moelle osseuses vers la circulation, provoqueraient l'écroulement des fonctions physiologiques de la niche osseuse s'ils étaient administrés à long terme [151].

Le second et nouvellement découvert récepteur de SDF-1 (CXCR7) promet de faire avancer la compréhension de la régulation de la chimiotaxie vers SDF-1, et pourrait même permettre l'amélioration des marqueurs de pronostics et des traitements anti-cancéreux.

L'incompréhension des méthodes de signalisation de CXCR7 a rapidement mené à sa classification prématurée en tant que facteur pro-metastatique, basé sur

l'observation incomplète de sa tendance à se retrouver surexprimé dans les tumeurs fortement métastatiques et sur l'efficacité antitumorale des bloqueurs spécifiques au site de liaison SDF-1/CXCR7 [170, 195, 196].

La découverte de voies de signalisation alternatives pour CXCR7 (tel que le recrutement des  $\beta$ -arrestines) qui sont activées par les supposés bloqueurs du site de liaison SDF-1/CXCR7 [188] nous force à réexaminer cette hypothèse, et la démonstration récente de plusieurs niveaux d'interactions et de régulation croisée entre CXCR4 et CXCR7 nous mène à proposer que le phénotype biologique de migration vers SDF-1 soit en fait le résultat d'un équilibre finement régulé entre les deux récepteurs.

Cette hypothèse nous force à examiner les conséquences biologiques de l'expression des deux récepteurs de SDF-1 dans une étude simultanée et comparative. Pour ce faire, l'expression et la localisation des deux récepteurs de SDF-1 ont été mesurés à plusieurs niveaux dans différents types de cellules leucémiques, et ont été corrélées avec leur comportement physiologique.

#### 4.0 La présence intracellulaire de CXCR7

La première chose que nous avons démontrée dans ce projet de maîtrise est la présence de CXCR7 dans des lignées cellulaires leucémiques. Ceci est important, parce que l'expression de ce récepteur dans les globules blancs ne fait pas consensus, et bien que l'expression de CXCR7 ait déjà été rapportée dans les lymphocytes B [165] certains éléments de la littérature ont déjà avancé que CXCR7 n'était pas exprimé dans les lymphocytes B, lymphocytes T et monocytes humains [201]. Nos résultats démontrent pourtant l'expression de CXCR7 au niveau de l'ARN messenger dans les lignées cellulaires leucémiques humaines de cellules progénitrices de lymphocytes B "REH", de cellules myéloïdes pré-érythrocytes K562 et de lymphocytes T "CEM" (**Figure 3.1**). Une explication possible serait que CXCR7 soit exprimé dans les leucocytes leucémiques, mais pas dans les globules blanc normaux.

En plus de l'expression de CXCR7 au niveau de l'ARN messenger, nous avons aussi observé que le récepteur CXCR7 est localisé, au niveau protéique, en presque totalité dans des réserves intracellulaires (**Figure 3.2**). Ceci est une information importante, parce que la chimiokine SDF-1 (ligand de CXCR7) ne peut pas traverser la membrane cellulaire. Cela implique que la liaison de SDF-1 à CXCR7 se produit soit sur la très petite population de récepteurs présents à la membrane à l'état basal, ou sur des récepteurs passagers qui sont relocalisés temporairement à la surface (ou recyclés rapidement entre la surface et le milieu intracellulaire) [192].



Ces résultats font écho à ce qui a depuis été publié dans la littérature, alors que plusieurs équipes de recherche ont observés que le récepteur CXCR7 ne se trouve qu'en petite quantité à la membrane cellulaire et recycle rapidement entre le milieu intracellulaire et la surface, et ce, en présence ou en absence de ligand. [176, 185, 202].

#### **4.1-Les variabilités dans le patron d'expression de CXCR4 et CXCR7**

Dans ce projet de recherche, nous avons observés que les quantités exprimées de CXCR4 et de CXCR7 ne sont pas les mêmes dans les différentes lignées leucémiques à l'étude (**Figure 3.1**). Ceci peut s'expliquer par le fait que le rôle physiologique et que l'état de différenciations des cellules hématopoïétiques dont les lignées leucémiques sont issues sont également très différentes, et qu'il est donc attendu d'observer un patron d'expression de récepteurs différent entre les REH (pré-lymphocytes B), les K562 (myéloïdes pré-érythrocytes ou granulocytes) et les CEM (Lymphocytes T) [165].

Nous avons également observé dans ce projet que l'ampleur de l'expression des récepteurs CXCR4 et CXCR7 pouvait varier de façon importante entre les expériences effectuées sur une même lignée leucémique (**Figure 3.4A**), et que cette variation s'accompagne de changements au niveau de l'efficacité de migration (**Figure 3.4B**). Cette information est importante, car elle nous permet par la suite d'étudier la présence d'un lien entre le niveau d'expression des récepteurs et l'efficacité de migration des cellules

Il est malheureusement difficile de démontrer hors de tout doute que cette variation de l'expression des récepteurs est naturelle, car plusieurs types d'erreurs expérimentales et d'incertitudes sur les méthodes pourraient être à la base de cette variance. La validité de cette observation a été donc vérifiée par la comparaison de l'expression de CXCR4 et CXCR7 avec le marqueur (CD45) (**Figure 3.4A**), ce qui a confirmé nos observations. De plus, un phénomène de régulation de l'expression ne serait pas inattendu pour les récepteurs de SDF-1, car il a déjà été démontré que l'expression de CXCR4 ou CXCR7 est fortement régulé en réponse aux conditions extérieures, que ce soit la confluence cellulaire, l'oxygénation du milieu ou la température [58, 82, 203]. Bien sûr, tous ces facteurs sont contrôlés au cours du projet de recherche, mais il serait possible que nos cellules adaptent leur expression de CXCR4/CXCR7 en réponse à d'autres éléments encore indéterminés.

Concernant l'efficacité de migration, il est difficile de trouver un contrôle qui écarterait complètement la possibilité que les variations observées soient dues à l'imprécision des instruments, l'imprécision de la démarche, ou à des erreurs expérimentales. Toutefois, comme on peut le voir dans les étapes subséquentes du projet, les variations entre les expériences de l'efficacité de migration des cellules semblent corrélées de façon significative avec le niveau d'expression de récepteurs de SDF-1. Il est donc peu probable que les différences observées entre les expériences soient dues à des erreurs expérimentales. De plus, la meilleure réponse migratoire se retrouve toujours avec la même concentration de CXCL12 dans toutes les expériences, soit 1nM CXCL12 (**Figure 3.3B**), ce qui tend à supporter la validité des techniques de mesure utilisés.

## **4.2- Corrélation entre le niveau d'expression de CXCR4, le niveau d'expression de CXCR7 et l'efficacité de la migration**

### **CXCR4**

Il est concevable que le profil d'expression de CXCR4 dans les différentes lignées corresponde à leur efficacité en chimiotaxie vers SDF-1. En effet, plusieurs équipes de recherche ont déjà tenté de corréler le niveau d'expression de CXCR4 avec le potentiel de migration des cellules, avec des résultats mitigés [40, 157, 158, 204]. Cette hypothèse est supportée par nos résultats, alors que la lignée cellulaire qui exprime le plus fortement CXCR4 (les cellules REH) au niveau de l'ARN messager (**Figure 3.1**) et au niveau protéique (**Figure 3.2.2**) possède aussi la plus grande efficacité chimiotactique (**Figure 3.3**), alors que la lignée cellulaire qui exprime le plus faiblement CXCR4 (les cellules CEM) au niveau de l'ARN messager (**Figure 3.1**) et au niveau protéique (**Figure 3.2.2**) possède l'efficacité chimiotactique la plus faible (**Figure 3.3**). Ces observations supportent l'objectif final, qui consiste à utiliser les niveaux d'expression d'une population cancéreuse en tant qu'indicateur de ses propriétés biologiques.

C'est dans cette optique que nous avons décidé de poursuivre le projet en prenant des mesures fréquentes de l'expression des deux récepteurs de CXCL12 et ce, dans diverses conditions et dans diverses lignées leucémiques, de façon à pouvoir les comparer à l'efficacité de migration des cellules et maximiser nos chances de découvrir des indices fiables sur l'impact de l'expression de CXCR4 et CXCR7 sur la chimiotaxie.

Conséquemment, il a été observé que l'ampleur de l'expression du récepteurs CXCR4 peut varier de façon importante entre les expériences dans une même lignée cellulaire (**Figure 3.4A**), et que cette variation s'accompagne de changements au niveau de l'efficacité de migration (**Figure 3.4B**) d'une façon où l'expression de CXCR4 corrèle positivement et d'une façon statistiquement significative avec l'efficacité de migration des cellules (**Figure 3.5.1A** et **Figure 3.5.2A**).

Ces résultats supportent ce qui est présent dans la littérature, car il a déjà été proposé que le degré d'expression de CXCR4 puisse être utilisé comme marqueur prédictif des métastases dans le cancer [158]. Toutefois, les résultats de notre projet de recherche ont démontrés clairement que cette corrélation était présente dans les leucémies humaines et qu'elle prenait la forme d'une corrélation linéaire.

## **CXCR7**

Nous sommes les premiers à avoir analysé la corrélation entre le niveau d'expression de CXCR7 et l'efficacité de migration des cellules leucémiques. Aussi, durant ce projet, un objectif important était de mesurer l'impact de l'expression de CXCR7 sur la migration chimiotactique in-vitro.

Nous savions déjà que, hormis son ligand naturel, CXCR7 lie AMD3100, un antagoniste de CXCR4. Toutefois, contrairement à son action antagoniste sur CXCR4, AMD3100 est un agoniste de CXCR7 pour la voie du recrutement de la B-arrestine [161, 174, 184, 187, 188]. Basé sur ces données, nous avons formulé

l'hypothèse que l'activation de CXCR7 provoquait un effet contraire à celui de CXCR4, et que la régulation chimiotactique des deux récepteurs soit opposée l'un à l'autre. Aussi, il était attendu que le niveau d'expression de CXCR7 corrèle négativement avec l'efficacité de migration des cellules leucémiques.

Nos résultats n'ont pas permis de confirmer cette hypothèse. En effet, bien que la lignée cellulaire qui exprime le plus faiblement CXCR7 (les cellules REH) au niveau de l'ARN messager (**Figure 3.1**) et au niveau protéique (**Figure 3.2.2**) possède aussi la plus grande efficacité chimiotactique (**Figure 3.3**), alors que la lignée cellulaire qui exprime le plus fortement CXCR7 (les cellules CEM) au niveau de l'ARN messager (**Figure 3.1**) possède l'efficacité chimiotactique la plus faible (**Figure 3.3**), la corrélation entre le niveau d'expression de CXCR7 et l'efficacité de migration des cellules n'est pas statistiquement significative (**Figure 3.5.1B** et **3.5.2B**). Toutefois, il serait approprié de se demander s'il serait possible d'obtenir une corrélation statistiquement significative par l'analyse d'un plus grand nombre d'expériences, d'un plus grand nombre de répétitions ou d'un raffinement de la technique.

#### **4.3-La meilleure corrélation se trouve entre le ratio CXCR4/CXCR7 et l'efficacité de migration.**

L'intérêt d'établir une corrélation efficace entre les valeurs d'expression des récepteurs de SDF-1 et le comportement chimiotactique des cellules leucémiques est considérable. Toutefois, l'étude de l'expression de CXCR4 seule n'a jusqu'ici jamais permis d'obtenir un facteur de prédiction suffisamment puissant pour être

utilisé au niveau clinique. Il existe même des contradictions dans la littérature concernant la corrélation entre le degré d'expression de CXCR4 et l'efficacité de la migration. En effet, malgré le rôle suspecté de CXCR4 dans l'efficacité de la chimiotaxie [40, 157, 158, 204], certaines publications ont déjà proposées que l'efficacité de la réponse envers SDF-1 ne corrèle pas avec l'expression de CXCR4 dans les cellules B humaines [154, 205].

Nos résultats démontrent le contraire (**Figure 3.5.1A**) alors que nous observons une corrélation statistiquement significative entre l'expression de CXCR4 et l'efficacité de migration dans les cellules leucémiques pre-B REH et dans les cellules myéloïdes indifférenciées K562.

De plus, nos résultats suggèrent l'existence d'un nouveau facteur de prédiction du potentiel de migration, le ratio  $CXCR4_{\text{surface}} / CXCR7_{\text{intracellulaire}}$ , obtenu en divisant les quantités de CXCR4 mesuré à la surface cellulaire des lymphocytes par les quantités de CXCR7 mesurées dans leurs compartiments intracellulaires. Nos résultats suggèrent que ce rapport corrèle de façon supérieure avec le comportement migratoire cellulaire et possède une capacité de prédiction significativement plus puissante que tous les autres facteurs de prédictions analysés en ce qui a trait à la chimiotaxie vers SDF-1 *in-vitro* (**Figure 3.5.1C** et **Figure 3.5.2C**).

Pour s'assurer que la corrélation observée ne soit pas le résultat d'une observation indirecte d'un phénomène de relocalisation générale des récepteurs (le CXCR4 est quantifié en surface alors que la mesure du CXCR7 provient des compartiments intracellulaires, il aurait été possible que des mécanismes de transport ou de

recyclage généraux des récepteurs soient en cause), nous avons effectué des expériences supplémentaires pour vérifier la relations entre différentes populations de récepteurs. Par exemple : l'étude du ratio CXCR4<sub>surface</sub>/CXCR4<sub>intracellulaire</sub> (**Figure 3.5.1F**) et CXCR4<sub>intracellulaire</sub>/CXCR7<sub>intracellulaire</sub> (**Figure 3.5.1E**). Mais aucun de ces résultats n'a permis d'obtenir une corrélation envers l'efficacité de migration des cellules. Ces résultats suggèrent donc que le ratio CXCR4<sub>surface</sub>/CXCR7<sub>intracellulaire</sub> possède une valeur prédictive unique.

Ces observations suggèrent que l'étude jumelée des deux récepteurs permet l'obtention d'un marqueur de prédiction de la chimiotaxie plus efficace que la mesure d'un récepteur seul. De plus, ces observations ouvrent la porte a la possibilité d'utiliser le ratio CXCR4/CXCR7 comme marqueur de prédiction in-vivo, ou là disponibilité d'un marqueur de prédiction du potentiel métastatique des tumeurs efficace et facilement mesurable est très recherché.

Le fait que les niveaux d'expression de CXCR7 pris individuellement ne corrèlent pas d'une façon statistiquement significative avec la migration (**Figure 3.5.1B** et **Figure 3.5.2B**) alors que nos résultats suggèrent clairement que CXCR7 s'oppose à CXCR4 (étant donné la validité du ratio CXCR4/CXCR7 pour prédire la force de la chimiotaxie) pourrait s'expliquer par le fait que CXCR4 provoque directement la chimiotaxie, alors que CXCR7 serait plutôt un régulateur de l'axe CXCR4/SDF-1. Cette hypothèse est supportée par plusieurs publications dans la littérature [166, 193, 202].

#### 4.4.1-Conséquences de la surexpression de CXCR4

Dans le but de démontrer la validité de notre interprétation du rôle de CXCR4 sur la migration vers SDF-1, nous avons surexprimés CXCR4 dans les lignées leucémiques à l'étude. Contrairement à nos attentes, la surexpression du récepteur CXCR4 dans les cellules K562 n'a pas provoqué de changement significatif dans leurs comportements chimiotactique (**Figure 3.6F**). Ceci est étonnant, car malgré les résultats publiés dans la littérature qui prétendent que le potentiel de migration n'est pas contrôlé par le niveau d'expression de CXCR4 [154, 205], nous avons nous-mêmes observés une forte corrélation entre l'expression de CXCR4 et l'efficacité de migration des cellules leucémiques lors de l'étape précédente du projet (**Figure 3.5.1A** et **Figure 3.6A**).

Une possibilité qui expliquerait ce phénomène serait que le tag fluorescent –YFP lié au récepteur surexprimé interférerait avec sa fonction. Les récepteurs CXCR4 surexprimés seraient alors sans conséquence sur la migration. Toutefois, il a déjà été démontré dans la littérature que la protéine CXCR4-YFP était fonctionnelle [119, 129]. Une autre explication serait que les mécanismes de signalisation et de transduction du signal de CXCR4 soient simplement déjà saturés par les quantités naturelles de récepteurs présents à la membrane et que la surexpression massive de CXCR4-YFP soit sans effet à cause de la saturation de ces mécanismes.

Une autre possibilité serait que les mécanismes de régulation de l'effet de CXCR4 sur la migration soient simplement saturés avec les niveaux d'expression normaux



de CXCR4 et que la surexpression de CXCR4 ne produise pas d'effet discernable sur l'efficacité de migration pour cette raison.

#### **4.4.2-Conséquences de la surexpression de CXCR7**

Dans le but de démontrer la validité de notre interprétation du rôle de CXCR7 sur l'axe CXCR4/SDF-1, nous avons surexprimés CXCR7 dans la lignée leucémiques K562. Nos résultats ont démontré que la surexpression du récepteur CXCR7 provoque une diminution du potentiel de migration des cellules concernées. En effet, les cellules leucémiques «High CXCR7-YFP» ont une chimiotaxie fortement réduite (**Figure 3.6** et **Figure 3.7.1**). Ces résultats appuient notre hypothèse de départ selon laquelle CXCR7 possède un rôle opposé à celui de CXCR4 dans la régulation de la chimiotaxie, et renforcent l'hypothèse selon laquelle le ratio CXCR4/CXCR7 est un marqueur de prédiction efficace du potentiel de migration des cellules.

Ces observations vont à l'encontre de plusieurs publications dans la littérature, où une expression élevée de CXCR7 est initialement présentée comme un facteur pro-chimiotactique [170, 195, 196], mais fait écho à des publications plus récentes qui suggèrent que CXCR7 s'oppose à la voie de CXCR4 [105, 180, 197, 206].

Cette contradiction apparente peut s'expliquer par le fait que la surexpression de CXCR7 puisse affecter positivement l'efficacité de la migration des cellules avoisinantes. En effet, les résultats obtenus dans l'étape subséquente du projet ont suggéré que la surexpression de CXCR7 dans les K562 augmentait le potentiel de

migration des cellules contrôles non-transfectées qui partageaient le même environnement (**Figure 3.7.1** et **Figure 3.7.2**).

#### **4.4.3-Effet de la surexpression de CXCR7 sur les cellules avoisinantes**

Pour mettre à jour ce nouvel aspect de la régulation par CXCR7, il a été nécessaire d'analyser séparément les cellules (pré et post migration) et de les analyser en se basant sur leur expression (ou non) du tag –YFP. Cette séparation était nécessaire étant donné que l'efficacité de transfection n'était pas de 100% dans les cellules étudiées, mais qu'il était très difficile de séparer physiquement les cellules non-transfectées des cellules transfectées préalablement à la migration.

Cette étape nous a permis de constater que les cellules qui surexpriment CXCR7-YFP subissent une forte diminution de leur potentiel de migration par rapport à la normale (**Figure 3.6E** et **Figure 3.6F**), mais que les cellules non transfectées qui partagent le même puits de migration que les cellules transfectées voyaient leur efficacité de migration au travers de la membrane poreuse augmenter de façon importante (**Figure 3.7.1** et **Figure 3.7.2**).

Pour s'assurer que l'effet pro-migratoire produit par la surexpression de CXCR7 sur les cellules voisines ne soit pas une particularité unique de la lignée K562, nous avons reproduit cet effet en surexprimant CXCR7 dans la lignée cellulaire HEK et en faisant partager le même puits de migration à des HEK transfectés surexprimant CXCR7 et à des REH non transfectés (**Figure 3.7.2**). Les résultats obtenus confirment que la présence de cellules qui expriment CXCR7 dans l'environnement

immédiat de migration produit un effet bénéfique sur l'efficacité de la migration des cellules avoisinantes (ce qui est fait écho aux travaux de *Naumann et al* dans le poisson zèbre), et que ce phénomène ne se limite pas à la lignée leucémique K562.

Cette découverte fortuite permet de proposer un aspect nouveau et surprenant dans la régulation de la chimiotaxie, soit une dualité de l'effet de l'expression du récepteur CXCR7 : Il produirait un effet anti-migratoire sur la cellule qui l'exprime, mis en évidence par le faible potentiel migratoire des cellules ayant un faible ratio CXCR4/CXCR7 et par l'incapacité à migrer des cellules surexprimant CXCR7, et un effet pro-migratoire sur les cellules présentes dans l'environnement immédiat, ce qui a été mis en évidence par le potentiel de migration supérieur des cellules qui partagent le puits de migration des « +CXCR7-YFP ».

Si cette hypothèse était confirmée, elle pourrait expliquer les contradictions présentes dans la littérature concernant le rôle de CXCR7. En effet, si l'on n'analyse pas séparément les cellules en se basant sur leurs niveaux d'expression de CXCR7 individuelles, il est facile de conclure que la surexpression de CXCR7 est un facteur global positif pour la chimiotaxie.

Il serait possible que l'effet positif de la surexpression de CXCR7 sur la migration des cellules avoisinantes passe par un contrôle de la disponibilité de la chimiokine dans le compartiment supérieur du puits de migration. Ce concept est déjà présent dans la littérature : les travaux de *Boldajipour et al* [163] ont suggéré que CXCR7 n'est pas requis pour la migration cellulaire, mais que la présence de CXCR7 dans les tissus avoisinants les cellules migratoires permet de séquestrer le SDF-1 présent

dans l'environnement immédiat, ce qui permet l'établissement d'un gradient de chimiokine efficace et produisait une modulation positive sur l'axe chimiotactique CXCR4/SDF-1. Ces observations sont supportées par les travaux de *Naumann et al [185]*. Toutefois, *Boldajipour et al [163]* suggère également que la séquestration de SDF-1 est l'unique fonction de CXCR7. Nos résultats contredisent cette affirmation, étant donné que nous avons observé que la surexpression de CXCR7 produisait également une modulation négative sur le potentiel de migration des cellules transfectés, d'une façon qui s'oppose aux fonctions de CXCR4, ce qui a été démontré par la faible efficacité de migration des cellules qui surexpriment CXCR7.

#### **4.5-Mécanismes possibles de la régulation de la chimiotaxie par CXCR7 et CXCR4**

Il serait possible que le récepteur CXCR7 module simultanément l'axe CXCR4/SDF-1 par deux voies : Premièrement, par son endocytose et recyclage rapide vers surface cellulaire (ce qui aurait pour conséquence d'acheminer SDF-1 à la dégradation, et de maintenir ainsi un gradient de chimiokines efficace dans le milieu extracellulaire) et deuxièmement, par une cascade signalétique intracellulaire encore inconnue indépendante des protéines G (par exemple, par la voie des  $\beta$ -arrestines), laquelle pourrait avoir un effet inhibiteur sur l'axe CXCR4/SDF-1 et bloquer la migration.

La première partie de cette hypothèse est supportée par nos résultats, qui démontrent que la surexpression de CXCR7 provoque une augmentation importante

de l'internalisation de SDF-1 radioactif (**Figure 3.7.3**), ce qui fait écho aux résultats publiés par *Naumann et al* [185]. De plus, l'incubation de cellules chimiotactiques avec le surnageant des cellules qui surexpriment CXCR7 ne produit aucune modification de l'efficacité de migration (**Figure 3.7.2**), ce qui écarte la possibilité de la sécrétion d'un facteur pro-migratoire soluble.

La deuxième partie de cette hypothèse est supportée par nos résultats, qui démontrent que la surexpression de CXCR7 provoque une diminution importante de l'efficacité de migration des cellules transfectés (**Figure 3.6E et Figure 3.6G**), sans que cela ne soit dû à la transfection (**Figure 3.6D**) ou à la composition du milieu de migration (**Figure 3.7A, Figure 3.7B et Figure 3.7.2**).

La deuxième partie de cette hypothèse est également supportée par les travaux récents de nombreuses équipes de recherche qui font état de l'existence d'une voie signalétique de régulation propre à CXCR7 qui est indépendante de la signalisation par les protéines G [170, 171, 175, 178, 181]. Cette hypothèse est également supportée par des études récentes, ainsi que par les publications qui suggèrent un contrôle antagoniste entre CXCR7 et CXCR4 dans le contrôle de la chimiotaxie [180, 197, 206].

Si cette hypothèse venait à être confirmée, elle pourrait servir de base pour le développement de stratégie anticancéreuse future. En effet, les conséquences cliniques de la dissémination des métastases à partir d'une tumeur primaire font en sorte qu'il serait souhaitable d'empêcher la dégradation de SDF-1 par CXCR7 (ce qui permet d'établir un gradient de migration) mais de conserver la capacité de

CXCR7 à réguler négativement le comportement de CXCR4. Une molécule agoniste qui bloquerait la liaison du SDF-1 à CXCR7 tout en activant sa voie de signalisation par les  $\beta$ -arrestines pourrait remplir ce rôle. Cette idée est supportée dans la littérature par l'étude de plusieurs molécules (AMD3100, CCX771, TC14012) qui agissent exactement de cette façon sur CXCR7 et provoquent une diminution significative de l'agressivité métastatique des tumeurs et de la dissémination des métastases dans la niche *in-vivo*, *in-vitro* et dans des études cliniques [161, 174, 184, 188].

## 4.6- Limitations de l'étude et perspectives

Une limitation importante de ce projet de recherche est que nous assumons que l'efficacité de migration des cellules leucémiques vers un gradient de SDF-1 corrèle avec la tendance des cellules cancéreuses à se disséminer dans l'organisme et à former des métastases, mais il est important de comprendre que la métastase cancéreuse est un processus complexe. Et bien que des études précédentes aient démontré des liens entre l'efficacité de migration des cellules cancéreuses et leurs potentiels métastatiques (228), il faut garder en tête lors de l'interprétation des résultats qu'il n'a jamais été démontré hors de tout doute que l'efficacité de migration se traduisait directement dans un phénotype métastatique, et il serait possible que nos résultats ne soient pas reproductibles *in-vivo*. Pour cette raison, il serait intéressant de tester la validité de nos résultats dans le modèle murin.

Une autre limitation du projet est que la mesure non-quantitative de l'ARN messager et la quantification de l'expression au niveau protéique ne permettent pas

de prendre en compte de nombreux facteurs dans l'étude du couple CXCR4/CXCR7. Ceci inclut la régulation au niveau de l'activation, de la signalisation, de la dimérisation, de la localisation, du trafficking, ou d'une possible internalisation des récepteurs. Ceci inclut également la possibilité que les récepteurs CXCR4 et CXCR7 interagissent physiquement entre-eux, la possibilité que leurs mécanismes de régulations respectifs soient entre-reliés, et la possibilité que leurs activations soit dépendante des conditions, de la localisation ou de facteurs ou cascades spécifiques à la lignée cellulaire. Toutefois, ces incertitudes n'empêchent pas que la mesure de l'expression de CXCR4 et de CXCR7 puisse constituer un indice prédictif important et très utile pour prédire le phénotype migratoire des cellules.

Une autre limitation du projet est notre incapacité à démontrer la source de la variabilité de l'expression des récepteurs de SDF-1. En effet, bien qu'il a déjà été proposé que l'expression de CXCR4 et de CXCR7 puisse être instable ou régulé en réponse aux conditions extérieures [203], l'origine de ce changement nous échappe actuellement, et cette incertitude limite la portée de nos conclusions.

Finalement, la plus grande limitation du projet consiste en notre ignorance du mécanisme par lequel CXCR7 influence la chimiotaxie. Les résultats publiés dans la littérature concernant les mécanismes de recyclage de CXCR7, du rôle de CXCR7 dans l'internalisation du SDF-1 et des mécanismes d'hétérodimérisation entre CXCR4 et CXCR7 nous permettent d'émettre des hypothèses sur les mécanismes qui expliquent la valeur prédictive du ratio CXCR4<sub>surface</sub> / CXCR7<sub>intracellulaire</sub> sur l'efficacité de migration des leucémies. Mais il serait

important de se pencher sur l'étude des mécanismes de signalisation et de régulation des récepteurs de SDF-1 dans le but d'expliquer la cause de nos observations et valider nos conclusions.



## 5. CONCLUSION

## 5.0 Conclusion

Dans le cadre de ce projet de maitrise, nous avons présenté une nouvelle méthode pour évaluer les prédispositions envers la chimiotaxie des cellules leucémiques via l'utilisation d'un rapport d'expression entre le récepteur CXCR4 et CXCR7.

Nous avons démontré non seulement que cette méthode est efficace, mais aussi que cette méthode est statistiquement plus puissante que la seule mesure du CXCR4, déjà utilisée dans la littérature comme marqueur prédictif [40, 155-160], que la mesure du CXCR7, ou toute autre valeur basé sur les l'expression des récepteurs de CXCL12.

L'utilisation de ce nouveau marqueur de pronostic in-vivo serait d'un grand intérêt, étant donné l'importance de connaître le potentiel métastatique des tumeurs dans le cadre de la sélection des traitements anticancéreux et dans l'évaluation du pronostic clinique. Il serait impératif d'évaluer la validité de cette technique *in-vivo*. L'utilisation d'échantillons de patients et la création de lignées leucémiques stables surexprimant l'un ou l'autre des récepteurs de SDF-1 et implantable dans le modèle murin devrait être la prochaine étape du projet.

## 6. RÉFÉRENCES

- [1] Cheshier SH, Morrison SJ, Liao X, Weissman IL. In vivo proliferation and cell cycle kinetics of long-term self-renewing hematopoietic stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1999;96:3120-5.
- [2] Morrison SJ, Spradling AC. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell* 2008;132:598-611.
- [3] Majka SM, Jackson KA, Kienstra KA, Majesky MW, Goodell MA, Hirschi KK. Distinct progenitor populations in skeletal muscle are bone marrow derived and exhibit different cell fates during vascular regeneration. *The Journal of clinical investigation* 2003;111:71-9.
- [4] Kopp HG, Avecilla ST, Hooper AT, Rafii S. The bone marrow vascular niche: home of HSC differentiation and mobilization. *Physiology* 2005;20:349-56.
- [5] Avecilla ST, Hattori K, Heissig B, Tejada R, Liao F, Shido K, et al. Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nature medicine* 2004;10:64-71.
- [6] Mayack SR, Wagers AJ. Osteolineage niche cells initiate hematopoietic stem cell mobilization. *Blood* 2008;112:519-31.
- [7] Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, et al. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 2003;425:841-6.
- [8] Fortunel NO, Hatzfeld JA, Monier MN, Hatzfeld A. Control of hematopoietic stem/progenitor cell fate by transforming growth factor-beta. *Oncology research* 2003;13:445-53.
- [9] Nie Y, Han YC, Zou YR. CXCR4 is required for the quiescence of primitive hematopoietic cells. *The Journal of experimental medicine* 2008;205:777-83.
- [10] Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity* 2006;25:977-88.
- [11] Wilson A, Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, et al. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* 2008;135:1118-29.
- [12] Kiel MJ, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature reviews Immunology* 2008;8:290-301.
- [13] Kurokawa M, Hirai H. Role of AML1/Runx1 in the pathogenesis of hematological malignancies. *Cancer science* 2003;94:841-6.
- [14] Statistics ACoC. Canadian Cancer Statistics. In: Society CC, editor. Toronto, ON: Canadian Cancer Society; 2013.

- [15] Kawauchi T. Cell Adhesion and Its Endocytic Regulation in Cell Migration during Neural Development and Cancer Metastasis. *International journal of molecular sciences* 2012;13:4564-90.
- [16] Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, Littman DR. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998;393:595-9.
- [17] Braun M, Wunderlin M, Spieth K, Knochel W, Gierschik P, Moepps B. *Xenopus laevis* Stromal cell-derived factor 1: conservation of structure and function during vertebrate development. *Journal of immunology* 2002;168:2340-7.
- [18] Gouwy M, Struyf S, Proost P, Van Damme J. Synergy in cytokine and chemokine networks amplifies the inflammatory response. *Cytokine & growth factor reviews* 2005;16:561-80.
- [19] Werner S, Grose R. Regulation of wound healing by growth factors and cytokines. *Physiological reviews* 2003;83:835-70.
- [20] Gilbert JA, Simpson AE, Rudnick DE, Geroski DH, Aaberg TM, Jr., Edelhauser HF. Transscleral permeability and intraocular concentrations of cisplatin from a collagen matrix. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society* 2003;89:409-17.
- [21] Viola A, Luster AD. Chemokines and their receptors: drug targets in immunity and inflammation. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2008;48:171-97.
- [22] Wolf K, Friedl P. Molecular mechanisms of cancer cell invasion and plasticity. *The British journal of dermatology* 2006;154 Suppl 1:11-5.
- [23] Cotran RS, Mayadas-Norton T. Endothelial adhesion molecules in health and disease. *Pathologie-biologie* 1998;46:164-70.
- [24] Lauffenburger DA, Horwitz AF. Cell migration: a physically integrated molecular process. *Cell* 1996;84:359-69.
- [25] Bianco A, Poukkula M, Cliffe A, Mathieu J, Luque CM, Fulga TA, et al. Two distinct modes of guidance signalling during collective migration of border cells. *Nature* 2007;448:362-5.
- [26] Fernandez EJ, Lolis E. Structure, function, and inhibition of chemokines. *Annual review of pharmacology and toxicology* 2002;42:469-99.
- [27] Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nature immunology* 2001;2:123-8.
- [28] Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annual review of immunology* 2000;18:217-42.

- [29] Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 2000;12:121-7.
- [30] Mackay CR. Chemokines: immunology's high impact factors. *Nature immunology* 2001;2:95-101.
- [31] Proudfoot AE, Power CA, Schwarz MK. Anti-chemokine small molecule drugs: a promising future? *Expert opinion on investigational drugs* 2010;19:345-55.
- [32] Olson TS, Ley K. Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *American journal of physiology Regulatory, integrative and comparative physiology* 2002;283:R7-28.
- [33] Horuk R, Peiper SC. Chemokines: molecular double agents. *Current biology : CB* 1996;6:1581-2.
- [34] Salcedo R, Oppenheim JJ. Role of chemokines in angiogenesis: CXCL12/SDF-1 and CXCR4 interaction, a key regulator of endothelial cell responses. *Microcirculation* 2003;10:359-70.
- [35] Horuk R. Chemokine receptors. *Cytokine & growth factor reviews* 2001;12:313-35.
- [36] Murphy PM. Chemokines and the molecular basis of cancer metastasis. *The New England journal of medicine* 2001;345:833-5.
- [37] Fukuda S, Onishi C, Pelus LM. Trafficking of Acute Leukemia Cells – Chemokine Receptor Pathways that Modulate Leukemia Cell Dissemination 2011.
- [38] Pui CH, Howard SC. Current management and challenges of malignant disease in the CNS in paediatric leukaemia. *The lancet oncology* 2008;9:257-68.
- [39] Byrd JC, Edenfield WJ, Shields DJ, Dawson NA. Extramedullary myeloid cell tumors in acute nonlymphocytic leukemia: a clinical review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 1995;13:1800-16.
- [40] Shiozawa Y, Pedersen EA, Havens AM, Jung Y, Mishra A, Joseph J, et al. Human prostate cancer metastases target the hematopoietic stem cell niche to establish footholds in mouse bone marrow. *The Journal of clinical investigation* 2011;121:1298-312.
- [41] Zajchowski DA, Bartholdi MF, Gong Y, Webster L, Liu HL, Munishkin A, et al. Identification of gene expression profiles that predict the aggressive behavior of breast cancer cells. *Cancer research* 2001;61:5168-78.
- [42] Foster JR. The functions of cytokines and their uses in toxicology. *International journal of experimental pathology* 2001;82:171-92.
- [43] Graves DT, Jiang Y. Chemokines, a family of chemotactic cytokines. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists* 1995;6:109-18.

- [44] Tanase S. Cytokine Family Database. Cytokine Family Database (dbCFC). Kumamoto University: Japan Society for the Promotion of Science; 2001.
- [45] Mazo IB, von Andrian UH. Adhesion and homing of blood-borne cells in bone marrow microvessels. *Journal of leukocyte biology* 1999;66:25-32.
- [46] Bonecchi R, Locati M, Mantovani A. Chemokines and cancer: a fatal attraction. *Cancer cell* 2011;19:434-5.
- [47] Mantovani A, Savino B, Locati M, Zammataro L, Allavena P, Bonecchi R. The chemokine system in cancer biology and therapy. *Cytokine & growth factor reviews* 2010;21:27-39.
- [48] Abastado JP. The next challenge in cancer immunotherapy: controlling T-cell traffic to the tumor. *Cancer research* 2012;72:2159-61.
- [49] Nomura T, Hasegawa H. Chemokines and anti-cancer immunotherapy: anti-tumor effect of EBI1-ligand chemokine (ELC) and secondary lymphoid tissue chemokine (SLC). *Anticancer research* 2000;20:4073-80.
- [50] Steinberg M, Silva M. Plerixafor: A chemokine receptor-4 antagonist for mobilization of hematopoietic stem cells for transplantation after high-dose chemotherapy for non-Hodgkin's lymphoma or multiple myeloma. *Clinical therapeutics* 2010;32:821-43.
- [51] Springael JY, Urizar E, Parmentier M. Dimerization of chemokine receptors and its functional consequences. *Cytokine & growth factor reviews* 2005;16:611-23.
- [52] Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hebert CA, Horuk R, Matsushima K, et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacological reviews* 2000;52:145-76.
- [53] Allen SJ, Crown SE, Handel TM. Chemokine: receptor structure, interactions, and antagonism. *Annual review of immunology* 2007;25:787-820.
- [54] Thelen M. Dancing to the tune of chemokines. *Nature immunology* 2001;2:129-34.
- [55] Hamdan FF, Audet M, Garneau P, Pelletier J, Bouvier M. High-throughput screening of G protein-coupled receptor antagonists using a bioluminescence resonance energy transfer 1-based beta-arrestin2 recruitment assay. *Journal of biomolecular screening* 2005;10:463-75.
- [56] Rajagopalan L, Rajarathnam K. Structural basis of chemokine receptor function--a model for binding affinity and ligand selectivity. *Bioscience reports* 2006;26:325-39.
- [57] Petrushev B, Tomuleasa C, Susman S, Sorisau O, Aldea M, Kacso G, et al. The axis of evil in the fight against cancer. *Romanian journal of internal medicine = Revue roumaine de medecine interne* 2011;49:319-25.
- [58] Filmore D. It's a GPCR world. *Modern Drug Discovery* 2004.

- [59] Overington JP, Al-Lazikani B, Hopkins AL. How many drug targets are there? *Nature reviews Drug discovery* 2006;5:993-6.
- [60] Gales C, Rebois RV, Hogue M, Trieu P, Breit A, Hebert TE, et al. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nature methods* 2005;2:177-84.
- [61] Gales C, Van Durm JJ, Schaak S, Pontier S, Percherancier Y, Audet M, et al. Probing the activation-promoted structural rearrangements in preassembled receptor-G protein complexes. *Nature structural & molecular biology* 2006;13:778-86.
- [62] Wettschureck N, Moers A, Offermanns S. Mouse models to study G-protein-mediated signaling. *Pharmacology & therapeutics* 2004;101:75-89.
- [63] Lans WJ. Making Sense of G Proteins: Genetic Analysis of Sensory G Protein Signaling in the Nematode *C. Elegans* 2005.
- [64] Koenig JA, Edwardson JM. Endocytosis and recycling of G protein-coupled receptors. *Trends in pharmacological sciences* 1997;18:276-87.
- [65] Vauquelin G, Van Liefde I. G protein-coupled receptors: a count of 1001 conformations. *Fundamental & clinical pharmacology* 2005;19:45-56.
- [66] Gether U. Uncovering molecular mechanisms involved in activation of G protein-coupled receptors. *Endocrine reviews* 2000;21:90-113.
- [67] Thelen M, Thelen S. CXCR7, CXCR4 and CXCL12: an eccentric trio? *Journal of neuroimmunology* 2008;198:9-13.
- [68] Van Coillie E, Van Damme J, Opdenakker G. The MCP/eotaxin subfamily of CC chemokines. *Cytokine & growth factor reviews* 1999;10:61-86.
- [69] Kohidai J. Structure of chemokine families. In: *ChtxChemokineStruct*, editor. *Jpeg* 2006.
- [70] Blanpain C, Doranz BJ, Bondue A, Govaerts C, De Leener A, Vassart G, et al. The core domain of chemokines binds CCR5 extracellular domains while their amino terminus interacts with the transmembrane helix bundle. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:5179-87.
- [71] Iijima M, Huang YE, Devreotes P. Temporal and spatial regulation of chemotaxis. *Developmental cell* 2002;3:469-78.
- [72] Sasaki AT, Chun C, Takeda K, Firtel RA. Localized Ras signaling at the leading edge regulates PI3K, cell polarity, and directional cell movement. *The Journal of cell biology* 2004;167:505-18.
- [73] Funamoto S, Meili R, Lee S, Parry L, Firtel RA. Spatial and temporal regulation of 3-phosphoinositides by PI 3-kinase and PTEN mediates chemotaxis. *Cell* 2002;109:611-23.



- [74] Andrews S, Stephens LR, Hawkins PT. PI3K class IB pathway in neutrophils. *Science's STKE : signal transduction knowledge environment* 2007;2007:cm3.
- [75] Bourne HR, Weiner O. A chemical compass. *Nature* 2002;419:21.
- [76] Strieter RM, Burdick MD, Gomperts BN, Belperio JA, Keane MP. CXC chemokines in angiogenesis. *Cytokine & growth factor reviews* 2005;16:593-609.
- [77] Bachelder RE, Wendt MA, Mercurio AM. Vascular endothelial growth factor promotes breast carcinoma invasion in an autocrine manner by regulating the chemokine receptor CXCR4. *Cancer research* 2002;62:7203-6.
- [78] Shao H, Tan Y, Eton D, Yang Z, Uberti MG, Li S, et al. Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels. *Stem cells* 2008;26:1376-84.
- [79] Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, Springer TA. A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *The Journal of experimental medicine* 1996;184:1101-9.
- [80] Ara T, Tokoyoda K, Sugiyama T, Egawa T, Kawabata K, Nagasawa T. Long-term hematopoietic stem cells require stromal cell-derived factor-1 for colonizing bone marrow during ontogeny. *Immunity* 2003;19:257-67.
- [81] Ma Q, Jones D, Borghesani PR, Segal RA, Nagasawa T, Kishimoto T, et al. Impaired B-lymphopoiesis, myelopoiesis, and derailed cerebellar neuron migration in CXCR4- and SDF-1-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:9448-53.
- [82] Christensen JL, Wright DE, Wagers AJ, Weissman IL. Circulation and chemotaxis of fetal hematopoietic stem cells. *PLoS biology* 2004;2:E75.
- [83] Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2010;16:2927-31.
- [84] Sun X, Cheng G, Hao M, Zheng J, Zhou X, Zhang J, et al. CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 chemokine axis and cancer progression. *Cancer metastasis reviews* 2010;29:709-22.
- [85] Singh S, Singh UP, Grizzle WE, Lillard JW, Jr. CXCL12-CXCR4 interactions modulate prostate cancer cell migration, metalloproteinase expression and invasion. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 2004;84:1666-76.
- [86] Maksym RB, Tarnowski M, Grymala K, Tarnowska J, Wysoczynski M, Liu R, et al. The role of stromal-derived factor-1--CXCR7 axis in development and cancer. *European journal of pharmacology* 2009;625:31-40.

- [87] Akishima-Fukasawa Y, Nakanishi Y, Ino Y, Moriya Y, Kanai Y, Hirohashi S. Prognostic significance of CXCL12 expression in patients with colorectal carcinoma. *American journal of clinical pathology* 2009;132:202-10; quiz 307.
- [88] Imai H, Sunaga N, Shimizu Y, Kakegawa S, Shimizu K, Sano T, et al. Clinicopathological and therapeutic significance of CXCL12 expression in lung cancer. *International journal of immunopathology and pharmacology* 2010;23:153-64.
- [89] Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, Sormani MP, Falter J, Nerlich A, et al. CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *European journal of cancer* 2009;45:2579-87.
- [90] Wendt MK, Cooper AN, Dwinell MB. Epigenetic silencing of CXCL12 increases the metastatic potential of mammary carcinoma cells. *Oncogene* 2008;27:1461-71.
- [91] Crump MP, Gong JH, Loetscher P, Rajarathnam K, Amara A, Arenzana-Seisdedos F, et al. Solution structure and basis for functional activity of stromal cell-derived factor-1; dissociation of CXCR4 activation from binding and inhibition of HIV-1. *The EMBO journal* 1997;16:6996-7007.
- [92] Dealwis C, Fernandez EJ, Thompson DA, Simon RJ, Siani MA, Lolis E. Crystal structure of chemically synthesized [N33A] stromal cell-derived factor 1alpha, a potent ligand for the HIV-1 "fusin" coreceptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95:6941-6.
- [93] Shirozu M, Nakano T, Inazawa J, Tashiro K, Tada H, Shinohara T, et al. Structure and chromosomal localization of the human stromal cell-derived factor 1 (SDF1) gene. *Genomics* 1995;28:495-500.
- [94] Doranz BJ, Rucker J, Yi Y, Smyth RJ, Samson M, Peiper SC, et al. A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell* 1996;85:1149-58.
- [95] Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996;272:872-7.
- [96] Busillo JM, Benovic JL. Regulation of CXCR4 signaling. *Biochimica et biophysica acta* 2007;1768:952-63.
- [97] Miller RJ, Banisadr G, Bhattacharyya BJ. CXCR4 signaling in the regulation of stem cell migration and development. *Journal of neuroimmunology* 2008;198:31-8.
- [98] Ma Q, Jones D, Springer TA. The chemokine receptor CXCR4 is required for the retention of B lineage and granulocytic precursors within the bone marrow microenvironment. *Immunity* 1999;10:463-71.
- [99] Bryant J, Ahern DJ, Brennan FM. CXCR4 and vascular cell adhesion molecule 1 are key chemokine/adhesion receptors in the migration of cytokine-activated T cells. *Arthritis and rheumatism* 2012;64:2137-46.

- [100] De Clercq E. The AMD3100 story: the path to the discovery of a stem cell mobilizer (Mozobil). *Biochemical pharmacology* 2009;77:1655-64.
- [101] Tamamura H, Hori A, Kanzaki N, Hiramatsu K, Mizumoto M, Nakashima H, et al. T140 analogs as CXCR4 antagonists identified as anti-metastatic agents in the treatment of breast cancer. *FEBS letters* 2003;550:79-83.
- [102] Kollet O, Shivtiel S, Chen YQ, Suriawinata J, Thung SN, Dabeva MD, et al. HGF, SDF-1, and MMP-9 are involved in stress-induced human CD34+ stem cell recruitment to the liver. *The Journal of clinical investigation* 2003;112:160-9.
- [103] Ji JF, He BP, Dheen ST, Tay SS. Expression of chemokine receptors CXCR4, CCR2, CCR5 and CX3CR1 in neural progenitor cells isolated from the subventricular zone of the adult rat brain. *Neuroscience letters* 2004;355:236-40.
- [104] Vandercappellen J, Van Damme J, Struyf S. The role of CXC chemokines and their receptors in cancer. *Cancer letters* 2008;267:226-44.
- [105] Balabanian K, Lagane B, Infantino S, Chow KY, Harriague J, Moepps B, et al. The chemokine SDF-1/CXCL12 binds to and signals through the orphan receptor RDC1 in T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:35760-6.
- [106] Kawai T, Choi U, Whiting-Theobald NL, Linton GF, Brenner S, Sechler JM, et al. Enhanced function with decreased internalization of carboxy-terminus truncated CXCR4 responsible for WHIM syndrome. *Experimental hematology* 2005;33:460-8.
- [107] Scotton CJ, Wilson JL, Scott K, Stamp G, Wilbanks GD, Fricker S, et al. Multiple actions of the chemokine CXCL12 on epithelial tumor cells in human ovarian cancer. *Cancer research* 2002;62:5930-8.
- [108] Zlotnik A. Chemokines and cancer. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2006;119:2026-9.
- [109] Zlotnik A. Involvement of chemokine receptors in organ-specific metastasis. *Contributions to microbiology* 2006;13:191-9.
- [110] Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001;410:50-6.
- [111] Kofuku Y, Yoshiura C, Ueda T, Terasawa H, Hirai T, Tominaga S, et al. Structural basis of the interaction between chemokine stromal cell-derived factor-1/CXCL12 and its G-protein-coupled receptor CXCR4. *The Journal of biological chemistry* 2009;284:35240-50.
- [112] Friedl P, Hegerfeldt Y, Tusch M. Collective cell migration in morphogenesis and cancer. *The International journal of developmental biology* 2004;48:441-9.
- [113] Wu B, Chien EY, Mol CD, Fenalti G, Liu W, Katritch V, et al. Structures of the CXCR4 chemokine GPCR with small-molecule and cyclic peptide antagonists. *Science* 2010;330:1066-71.

- [114] Veldkamp CT, Seibert C, Peterson FC, De la Cruz NB, Haugner JC, 3rd, Basnet H, et al. Structural basis of CXCR4 sulfotyrosine recognition by the chemokine SDF-1/CXCL12. *Science signaling* 2008;1:ra4.
- [115] Brelot A, Heveker N, Pleskoff O, Sol N, Alizon M. Role of the first and third extracellular domains of CXCR-4 in human immunodeficiency virus coreceptor activity. *Journal of virology* 1997;71:4744-51.
- [116] Baribaud F, Edwards TG, Sharron M, Brelot A, Heveker N, Price K, et al. Antigenically distinct conformations of CXCR4. *Journal of virology* 2001;75:8957-67.
- [117] Huang X, Shen J, Cui M, Shen L, Luo X, Ling K, et al. Molecular dynamics simulations on SDF-1alpha: binding with CXCR4 receptor. *Biophysical journal* 2003;84:171-84.
- [118] Cotecchia S, Fanelli F, Costa T. Constitutively active G protein-coupled receptor mutants: implications on receptor function and drug action. *Assay and drug development technologies* 2003;1:311-6.
- [119] Berchiche YA, Chow KY, Lagane B, Leduc M, Percherancier Y, Fujii N, et al. Direct assessment of CXCR4 mutant conformations reveals complex link between receptor structure and G(alpha)(i) activation. *The Journal of biological chemistry* 2007;282:5111-5.
- [120] Busillo JM, Armando S, Sengupta R, Meucci O, Bouvier M, Benovic JL. Site-specific phosphorylation of CXCR4 is dynamically regulated by multiple kinases and results in differential modulation of CXCR4 signaling. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:7805-17.
- [121] Wang JF, Park IW, Groopman JE. Stromal cell-derived factor-1alpha stimulates tyrosine phosphorylation of multiple focal adhesion proteins and induces migration of hematopoietic progenitor cells: roles of phosphoinositide-3 kinase and protein kinase C. *Blood* 2000;95:2505-13.
- [122] Ottoson NC, Pribila JT, Chan AS, Shimizu Y. Cutting edge: T cell migration regulated by CXCR4 chemokine receptor signaling to ZAP-70 tyrosine kinase. *Journal of immunology* 2001;167:1857-61.
- [123] Fischer AM, Mercer JC, Iyer A, Ragin MJ, August A. Regulation of CXC chemokine receptor 4-mediated migration by the Tec family tyrosine kinase ITK. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:29816-20.
- [124] Vila-Coro AJ, Rodriguez-Frade JM, Martin De Ana A, Moreno-Ortiz MC, Martinez AC, Mellado M. The chemokine SDF-1alpha triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 1999;13:1699-710.
- [125] DeWire SM, Ahn S, Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Beta-arrestins and cell signaling. *Annual review of physiology* 2007;69:483-510.

- [126] Lefkowitz RJ, Shenoy SK. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science* 2005;308:512-7.
- [127] Fong AM, Premont RT, Richardson RM, Yu YR, Lefkowitz RJ, Patel DD. Defective lymphocyte chemotaxis in beta-arrestin2- and GRK6-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2002;99:7478-83.
- [128] Babcock GJ, Farzan M, Sodroski J. Ligand-independent dimerization of CXCR4, a principal HIV-1 coreceptor. *The Journal of biological chemistry* 2003;278:3378-85.
- [129] Percherancier Y, Berchiche YA, Slight I, Volkmer-Engert R, Tamamura H, Fujii N, et al. Bioluminescence resonance energy transfer reveals ligand-induced conformational changes in CXCR4 homo- and heterodimers. *The Journal of biological chemistry* 2005;280:9895-903.
- [130] Issafras H, Angers S, Bulenger S, Blanpain C, Parmentier M, Labbe-Jullie C, et al. Constitutive agonist-independent CCR5 oligomerization and antibody-mediated clustering occurring at physiological levels of receptors. *The Journal of biological chemistry* 2002;277:34666-73.
- [131] Wang X, Bo J, Bridges T, Dugan KD, Pan TC, Chodosh LA, et al. Analysis of cell migration using whole-genome expression profiling of migratory cells in the *Drosophila* ovary. *Developmental cell* 2006;10:483-95.
- [132] Toth PT, Ren D, Miller RJ. Regulation of CXCR4 receptor dimerization by the chemokine SDF-1alpha and the HIV-1 coat protein gp120: a fluorescence resonance energy transfer (FRET) study. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 2004;310:8-17.
- [133] Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science* 1996;272:60-6.
- [134] Premack BA, Schall TJ. Chemokine receptors: gateways to inflammation and infection. *Nature medicine* 1996;2:1174-8.
- [135] Lataillade JJ, Clay D, Dupuy C, Rigal S, Jasmin C, Bourin P, et al. Chemokine SDF-1 enhances circulating CD34(+) cell proliferation in synergy with cytokines: possible role in progenitor survival. *Blood* 2000;95:756-68.
- [136] Lapidot T, Dar A, Kollet O. How do stem cells find their way home? *Blood* 2005;106:1901-10.
- [137] Lapidot T, Kollet O. The essential roles of the chemokine SDF-1 and its receptor CXCR4 in human stem cell homing and repopulation of transplanted immune-deficient NOD/SCID and NOD/SCID/B2m(null) mice. *Leukemia* 2002;16:1992-2003.
- [138] Tavor S, Petit I, Porozov S, Avigdor A, Dar A, Leider-Trejo L, et al. CXCR4 regulates migration and development of human acute myelogenous leukemia stem cells in transplanted NOD/SCID mice. *Cancer research* 2004;64:2817-24.

- [139] Wilson A, Trumpp A. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nature reviews Immunology* 2006;6:93-106.
- [140] Kucia M, Rea R, Miekus K, Wanzeck J, Wojakowski W, Janowska-Wieczorek A, et al. Trafficking of normal stem cells and metastasis of cancer stem cells involve similar mechanisms: pivotal role of the SDF-1-CXCR4 axis. *Stem cells* 2005;23:879-94.
- [141] Mudry RE, Fortney JE, York T, Hall BM, Gibson LF. Stromal cells regulate survival of B-lineage leukemic cells during chemotherapy. *Blood* 2000;96:1926-32.
- [142] Tabe Y, Konopleva M, Contractor R, Munsell M, Schober WD, Jin L, et al. Up-regulation of MDR1 and induction of doxorubicin resistance by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228) and ATRA in acute promyelocytic leukemia cells. *Blood* 2006;107:1546-54.
- [143] Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *British journal of haematology* 1996;92:97-103.
- [144] Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood* 1998;91:2387-96.
- [145] De Clercq E. The bicyclam AMD3100 story. *Nature reviews Drug discovery* 2003;2:581-7.
- [146] Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood* 2000;96:2655-63.
- [147] Konopleva M, Konoplev S, Hu W, Zaritskey AY, Afanasiev BV, Andreeff M. Stromal cells prevent apoptosis of AML cells by up-regulation of anti-apoptotic proteins. *Leukemia* 2002;16:1713-24.
- [148] Broxmeyer HE, Orschell CM, Clapp DW, Hangoc G, Cooper S, Plett PA, et al. Rapid mobilization of murine and human hematopoietic stem and progenitor cells with AMD3100, a CXCR4 antagonist. *The Journal of experimental medicine* 2005;201:1307-18.
- [149] Fricker SP, Anastassov V, Cox J, Darkes MC, Grujic O, Idzan SR, et al. Characterization of the molecular pharmacology of AMD3100: a specific antagonist of the G-protein coupled chemokine receptor, CXCR4. *Biochemical pharmacology* 2006;72:588-96.
- [150] Liles WC, Broxmeyer HE, Rodger E, Wood B, Hubel K, Cooper S, et al. Mobilization of hematopoietic progenitor cells in healthy volunteers by AMD3100, a CXCR4 antagonist. *Blood* 2003;102:2728-30.
- [151] Burroughs L, Mielcarek M, Little MT, Bridger G, Macfarland R, Fricker S, et al. Durable engraftment of AMD3100-mobilized autologous and allogeneic peripheral-blood mononuclear cells in a canine transplantation model. *Blood* 2005;106:4002-8.

- [152] Spiegel A, Kollet O, Peled A, Abel L, Nagler A, Bielewicz B, et al. Unique SDF-1-induced activation of human precursor-B ALL cells as a result of altered CXCR4 expression and signaling. *Blood* 2004;103:2900-7.
- [153] Bodart V, Anastassov V, Darkes MC, Idzan SR, Labrecque J, Lau G, et al. Pharmacology of AMD3465: a small molecule antagonist of the chemokine receptor CXCR4. *Biochemical pharmacology* 2009;78:993-1000.
- [154] Honczarenko M, Douglas RS, Mathias C, Lee B, Ratajczak MZ, Silberstein LE. SDF-1 responsiveness does not correlate with CXCR4 expression levels of developing human bone marrow B cells. *Blood* 1999;94:2990-8.
- [155] Wang N, Wu QL, Fang Y, Mai HQ, Zeng MS, Shen GP, et al. Expression of chemokine receptor CXCR4 in nasopharyngeal carcinoma: pattern of expression and correlation with clinical outcome. *Journal of translational medicine* 2005;3:26.
- [156] Hiller D, Chu QD. CXCR4 and axillary lymph nodes: review of a potential biomarker for breast cancer metastasis. *International journal of breast cancer* 2011;2011:420981.
- [157] Gilbert DC, Chandler I, McIntyre A, Goddard NC, Gabe R, Huddart RA, et al. Clinical and biological significance of CXCL12 and CXCR4 expression in adult testes and germ cell tumours of adults and adolescents. *The Journal of pathology* 2009;217:94-102.
- [158] Jiang YP, Wu XH, Shi B, Wu WX, Yin GR. Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecologic oncology* 2006;103:226-33.
- [159] Ottaiano A, Franco R, Aiello Talamanca A, Liguori G, Tatangelo F, Delrio P, et al. Overexpression of both CXCR4 chemokine receptor 4 and vascular endothelial growth factor proteins predicts early distant relapse in stage II-III colorectal cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2006;12:2795-803.
- [160] Heesen M, Berman MA, Charest A, Housman D, Gerard C, Dorf ME. Cloning and chromosomal mapping of an orphan chemokine receptor: mouse RDC1. *Immunogenetics* 1998;47:364-70.
- [161] Burns JM, Summers BC, Wang Y, Melikian A, Berahovich R, Miao Z, et al. A novel chemokine receptor for SDF-1 and I-TAC involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. *The Journal of experimental medicine* 2006;203:2201-13.
- [162] Chandrasekar B, Bysani S, Mummidi S. CXCL16 signals via Gi, phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, I kappa B kinase, and nuclear factor-kappa B and induces cell-cell adhesion and aortic smooth muscle cell proliferation. *The Journal of biological chemistry* 2004;279:3188-96.
- [163] Boldajipour B, Mahabaleswar H, Kardash E, Reichman-Fried M, Blaser H, Minina S, et al. Control of chemokine-guided cell migration by ligand sequestration. *Cell* 2008;132:463-73.

- [164] Sierro F, Biben C, Martinez-Munoz L, Mellado M, Ransohoff RM, Li M, et al. Disrupted cardiac development but normal hematopoiesis in mice deficient in the second CXCL12/SDF-1 receptor, CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:14759-64.
- [165] Infantino S, Moepps B, Thelen M. Expression and regulation of the orphan receptor RDC1 and its putative ligand in human dendritic and B cells. *Journal of immunology* 2006;176:2197-207.
- [166] Levoe A, Balabanian K, Baleux F, Bachelier F, Lagane B. CXCR7 heterodimerizes with CXCR4 and regulates CXCL12-mediated G protein signaling. *Blood* 2009;113:6085-93.
- [167] Schonemeier B, Kolodziej A, Schulz S, Jacobs S, Hoell V, Stumm R. Regional and cellular localization of the CXCL12/SDF-1 chemokine receptor CXCR7 in the developing and adult rat brain. *The Journal of comparative neurology* 2008;510:207-20.
- [168] Gerrits H, van Ingen Schenau DS, Bakker NE, van Disseldorp AJ, Strik A, Hermens LS, et al. Early postnatal lethality and cardiovascular defects in CXCR7-deficient mice. *Genesis* 2008;46:235-45.
- [169] Miao Z, Luker KE, Summers BC, Berahovich R, Bhojani MS, Rehemtulla A, et al. CXCR7 (RDC1) promotes breast and lung tumor growth in vivo and is expressed on tumor-associated vasculature. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2007;104:15735-40.
- [170] Wang J, Shiozawa Y, Wang J, Wang Y, Jung Y, Pienta KJ, et al. The role of CXCR7/RDC1 as a chemokine receptor for CXCL12/SDF-1 in prostate cancer. *The Journal of biological chemistry* 2008;283:4283-94.
- [171] Hattermann K, Held-Feindt J, Lucius R, Muerkoster SS, Penfold ME, Schall TJ, et al. The chemokine receptor CXCR7 is highly expressed in human glioma cells and mediates antiapoptotic effects. *Cancer research* 2010;70:3299-308.
- [172] Singh RK, Lokeshwar BL. The IL-8-regulated chemokine receptor CXCR7 stimulates EGFR signaling to promote prostate cancer growth. *Cancer research* 2011;71:3268-77.
- [173] Watanabe K, Penfold ME, Matsuda A, Ohyanagi N, Kaneko K, Miyabe Y, et al. Pathogenic role of CXCR7 in rheumatoid arthritis. *Arthritis and rheumatism* 2010;62:3211-20.
- [174] Jin Z, Nagakubo D, Shirakawa AK, Nakayama T, Shigeta A, Hieshima K, et al. CXCR7 is inducible by HTLV-1 Tax and promotes growth and survival of HTLV-1-infected T cells. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2009;125:2229-35.
- [175] Odemis V, Boosmann K, Heinen A, Kury P, Engele J. CXCR7 is an active component of SDF-1 signalling in astrocytes and Schwann cells. *Journal of cell science* 2010;123:1081-8.
- [176] Hartmann TN, Grabovsky V, Pasvolsky R, Shulman Z, Buss EC, Spiegel A, et al. A crosstalk between intracellular CXCR7 and CXCR4 involved in rapid CXCL12-triggered



integrin activation but not in chemokine-triggered motility of human T lymphocytes and CD34+ cells. *Journal of leukocyte biology* 2008;84:1130-40.

[177] Graham GJ. D6 and the atypical chemokine receptor family: novel regulators of immune and inflammatory processes. *European journal of immunology* 2009;39:342-51.

[178] Grymula K, Tarnowski M, Wysoczynski M, Drukala J, Barr FG, Ratajczak J, et al. Overlapping and distinct role of CXCR7-SDF-1/ITAC and CXCR4-SDF-1 axes in regulating metastatic behavior of human rhabdomyosarcomas. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2010;127:2554-68.

[179] Rajagopal S, Kim J, Ahn S, Craig S, Lam CM, Gerard NP, et al. Beta-arrestin- but not G protein-mediated signaling by the "decoy" receptor CXCR7. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2010;107:628-32.

[180] Wang Y, Li G, Stanco A, Long JE, Crawford D, Potter GB, et al. CXCR4 and CXCR7 have distinct functions in regulating interneuron migration. *Neuron* 2011;69:61-76.

[181] Decaillot FM, Kazmi MA, Lin Y, Ray-Saha S, Sakmar TP, Sachdev P. CXCR7/CXCR4 heterodimer constitutively recruits beta-arrestin to enhance cell migration. *The Journal of biological chemistry* 2011;286:32188-97.

[182] Cruz-Orengo L, Holman DW, Dorsey D, Zhou L, Zhang P, Wright M, et al. CXCR7 influences leukocyte entry into the CNS parenchyma by controlling abluminal CXCL12 abundance during autoimmunity. *The Journal of experimental medicine* 2011;208:327-39.

[183] Dambly-Chaudiere C, Cubedo N, Ghysen A. Control of cell migration in the development of the posterior lateral line: antagonistic interactions between the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7/RDC1. *BMC developmental biology* 2007;7:23.

[184] Kalatskaya I, Berchiche YA, Gravel S, Limberg BJ, Rosenbaum JS, Heveker N. AMD3100 is a CXCR7 ligand with allosteric agonist properties. *Molecular pharmacology* 2009;75:1240-7.

[185] Naumann U, Cameroni E, Pruenster M, Mahabaleshwar H, Raz E, Zerwes HG, et al. CXCR7 functions as a scavenger for CXCL12 and CXCL11. *PloS one* 2010;5:e9175.

[186] Wei H, Ahn S, Shenoy SK, Karnik SS, Hunyady L, Luttrell LM, et al. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2003;100:10782-7.

[187] Zabel BA, Wang Y, Lewen S, Berahovich RD, Penfold ME, Zhang P, et al. Elucidation of CXCR7-mediated signaling events and inhibition of CXCR4-mediated tumor cell transendothelial migration by CXCR7 ligands. *Journal of immunology* 2009;183:3204-11.

[188] Gravel S, Malouf C, Boulais PE, Berchiche YA, Oishi S, Fujii N, et al. The peptidomimetic CXCR4 antagonist TC14012 recruits beta-arrestin to CXCR7: roles of receptor domains. *The Journal of biological chemistry* 2010;285:37939-43.

- [189] Thelen M, Munoz LM, Rodriguez-Frade JM, Mellado M. Chemokine receptor oligomerization: functional considerations. *Current opinion in pharmacology* 2010;10:38-43.
- [190] Lagane B, Chow KY, Balabanian K, Levoye A, Harriague J, Planchenault T, et al. CXCR4 dimerization and beta-arrestin-mediated signaling account for the enhanced chemotaxis to CXCL12 in WHIM syndrome. *Blood* 2008;112:34-44.
- [191] Salanga CL, O'Hayre M, Handel T. Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk. *Cellular and molecular life sciences : CMLS* 2009;66:1370-86.
- [192] Luker KE, Steele JM, Mihalko LA, Ray P, Luker GD. Constitutive and chemokine-dependent internalization and recycling of CXCR7 in breast cancer cells to degrade chemokine ligands. *Oncogene* 2010;29:4599-610.
- [193] Sanchez-Alcaniz JA, Haegel S, Mueller W, Pla R, Mackay F, Schulz S, et al. Cxcr7 controls neuronal migration by regulating chemokine responsiveness. *Neuron* 2011;69:77-90.
- [194] Sanchez-Martin L, Estechea A, Samaniego R, Sanchez-Ramon S, Vega MA, Sanchez-Mateos P. The chemokine CXCL12 regulates monocyte-macrophage differentiation and RUNX3 expression. *Blood* 2011;117:88-97.
- [195] Iwakiri S, Mino N, Takahashi T, Sonobe M, Nagai S, Okubo K, et al. Higher expression of chemokine receptor CXCR7 is linked to early and metastatic recurrence in pathological stage I nonsmall cell lung cancer. *Cancer* 2009;115:2580-93.
- [196] Xue TC, Chen RX, Han D, Chen J, Xue Q, Gao DM, et al. Down-regulation of CXCR7 inhibits the growth and lung metastasis of human hepatocellular carcinoma cells with highly metastatic potential. *Experimental and therapeutic medicine* 2012;3:117-23.
- [197] Hernandez L, Magalhaes MA, Coniglio SJ, Condeelis JS, Segall JE. Opposing roles of CXCR4 and CXCR7 in breast cancer metastasis. *Breast cancer research : BCR* 2011;13:R128.
- [198] Domanska UM, Timmer-Bosscha H, Nagengast WB, Oude Munnink TH, Kruizinga RC, Ananias HJ, et al. CXCR4 inhibition with AMD3100 sensitizes prostate cancer to docetaxel chemotherapy. *Neoplasia* 2012;14:709-18.
- [199] Asbury CL, Uy JL, van den Engh G. Polarization of scatter and fluorescence signals in flow cytometry. *Cytometry* 2000;40:88-101.
- [200] ECM506 MUGCN. QCM™ 5µm Chemotaxis Assay 24-well-Colorimetric User guide. In: Millipore, editor. Millipore User guides Cat No ECM506. [www.millipore.com](http://www.millipore.com); Millipore; 2008. p. 6.
- [201] Berahovich RD, Zabel BA, Penfold ME, Lewen S, Wang Y, Miao Z, et al. CXCR7 protein is not expressed on human or mouse leukocytes. *Journal of immunology* 2010;185:5130-9.

- [202] Shimizu S, Brown M, Sengupta R, Penfold ME, Meucci O. CXCR7 protein expression in human adult brain and differentiated neurons. *PloS one* 2011;6:e20680.
- [203] Carlisle AJ, Lyttle CA, Carlisle RY, Maris JM. CXCR4 expression heterogeneity in neuroblastoma cells due to ligand-independent regulation. *Molecular cancer* 2009;8:126.
- [204] Kato M, Kitayama J, Kazama S, Nagawa H. Expression pattern of CXC chemokine receptor-4 is correlated with lymph node metastasis in human invasive ductal carcinoma. *Breast cancer research : BCR* 2003;5:R144-50.
- [205] Holland JD, Kochetkova M, Akekawatchai C, Dottore M, Lopez A, McColl SR. Differential functional activation of chemokine receptor CXCR4 is mediated by G proteins in breast cancer cells. *Cancer research* 2006;66:4117-24.
- [206] Liberman J, Sartelet H, Flahaut M, Muhlethaler-Mottet A, Coulon A, Nyalendo C, et al. Involvement of the CXCR7/CXCR4/CXCL12 axis in the malignant progression of human neuroblastoma. *PloS one* 2012;7:e43665.